



CODA - CERVA

# AB susceptibility testing in support to responsible AB use in veterinary medicine : current challenges

Pierre WATTIAU

*Best Practice to reduce Antibiotic Resistance*

BAPCOC Symposium 18 NOV 2016

# New Royal Decree regulating the use of drugs by Vets and Animal owners (MB/BS 29-07-2016)

BELGISCH STAATSBLAD — 29.07.2016 — MONITEUR BELGE

46569

FEDERALE OVERHEIDSDIENST VOLKSGEZONDHEID,  
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN  
EN LEEFMILIEU  
EN FEDERAAL AGENTSCHAP VOOR GENEESMIDDELEN  
EN GEZONDHEIDSPRODUCTEN

SERVICE PUBLIC FEDERAL SANTE PUBLIQUE,  
SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE  
ET ENVIRONNEMENT  
ET AGENCE FEDERALE DES MEDICAMENTS  
ET DES PRODUITS DE SANTE

[C – 2016/24152]

[C – 2016/24152]

21 JULI 2016. — Koninklijk besluit betreffende de voorwaarden voor het gebruik van geneesmiddelen door de dierenartsen en door de verantwoordelijken van de dieren

21 JUILLET 2016. — Arrêté royal relatif aux conditions d'utilisation des médicaments par les médecins vétérinaires et par les responsables des animaux

FILIP, Koning der Belgen,

Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 25 maart 1964 op de geneesmiddelen, artikelen 12 sexties, § 3, vervangen bij de wet van 3 augustus 2012 en 12 septies, ingevoegd bij de wet van 1 mei 2006;

Gelet op de wet van 21 juni 1983 betreffende gemedicineerde dierenvoeders, artikel 3, 1<sup>o</sup>, gewijzigd bij de wet van 1 mei 2006;

Gelet op de wet van 28 augustus 1991 op de uitoefening van de diergeneeskunde, artikelen 9, § 2, 10, § 1, gewijzigd bij de wetten van 19 mei 2010 en van 22 juni 2016, 11, § 3 en 12, §§ 2 en 3;

Gelet op de wet van 20 juli 2006 betreffende de oprichting en de werking van het Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten, artikel 4, § 1, derde lid, 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 1), gewijzigd door de wet van 10 april 2014 en 6<sup>o</sup>, e), gewijzigd bij de wet van 10 april 2014;

Gelet op het koninklijk besluit van 23 mei 2000 houdende bijzondere bepalingen inzake het verwerven, het in depot houden, het voorschrijven, het verschaffen en het toedienen van geneesmiddelen bestemd voor dieren door de dierenarts en inzake het bezit en het toedienen van geneesmiddelen bestemd voor dieren door de verantwoordelijke voor de dieren;

Gelet op het koninklijk besluit van 10 april 2000 houdende bepalingen betreffende de diergeneeskundige bedrijfsbegeleiding;

Gelet op het advies van de inspecteur van Financiën, gegeven op 5 januari 2016;

Gelet op het advies van de Hoge Raad van de Orde der Dierenartsen, gegeven op 7 januari 2016;

Gelet op het advies van de Nationale Landbouwwaad, gegeven op 18 januari 2016;

Gelet op het overleg tussen de Gewestregeringen en de Federale Overheid op 25 januari 2016;

Gelet op het advies n<sup>o</sup> 59.115/3 van de Raad van State, gegeven op 17 mei 2016, met toepassing van artikel 84, § 1, eerste lid, 1<sup>o</sup>, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973;

PHILIPPE, Roi des Belges,

A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 25 mars 1964 sur les médicaments, les articles 12 sexties, § 3, remplacé par la loi du 3 août 2012 et 12 septies, inséré par la loi du 1<sup>er</sup> mai 2006;

Vu la loi du 21 juin 1983 relative aux aliments médicamenteux pour animaux, l'article 3, 1<sup>o</sup>, modifié par la loi du 1<sup>er</sup> mai 2006;

Vu la loi du 28 août 1991 sur l'exercice de la médecine vétérinaire, les articles 9, § 2, 10, § 1<sup>er</sup>, modifiée par les lois du 19 mai 2010 et du 22 juin 2016, 11, § 3 et 12, §§ 2 et 3;

Vu la loi du 20 juillet 2006 relative à la création et au fonctionnement de l'Agence fédérale des médicaments et des produits de santé, l'article 4, § 1<sup>er</sup>, alinéa 3, 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, d), modifié par la loi du 10 avril 2014 et 6<sup>o</sup>, e), modifié par la loi du 10 avril 2014;

Vu l'arrêté royal du 23 mai 2000 portant des dispositions particulières concernant l'acquisition, la détention d'un dépôt, la prescription, la fourniture et l'administration de médicaments destinés aux animaux par le médecin vétérinaire et concernant la détention et l'administration de médicaments destinés aux animaux par le responsable des animaux;

Vu l'arrêté royal du 10 avril 2000 portant des dispositions relatives à la guidance vétérinaire;

Vu l'avis de l'Inspecteur des Finances, donné le 5 janvier 2016;

Vu l'avis du Conseil Supérieur de l'Ordre des Médecins vétérinaires, donné le 7 janvier 2016;

Vu l'avis du Conseil National de l'Agriculture, donné le 18 janvier 2016;

Vu la concertation entre les Gouvernements régionaux et l'Autorité fédérale du 25 janvier 2016;

Vu l'avis n<sup>o</sup> 59.115/3 du Conseil d'Etat, donné le 17 mai 2016, en application de l'article 84, § 1<sup>er</sup>, alinéa 1<sup>er</sup>, 1<sup>o</sup>, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973;

# New Royal Decree regulating the use of drugs by Vets and Animal owners (MB/BS 29-07-2016)



CODA - CERVA



- **DRUG DEPOSIT** : Admin. management, Registering, Reporting, Archiving, Transferring
- **DRUG DELIVERY** : Registering, Prescription to FOOD / NON-FOOD producing animals
- **SPECIAL MEASURES** (not for HORSES nor for INTRA-HUDDER delivery of critical ABs)
  - Use of critical ABs (FQ1,2,3 + CEPH 3,4) is **forbidden** unless a number of criteria are fulfilled. These criteria include
    - lab isolation of the disease-causing bacterium,
    - demonstration of its resistance to  $\geq 5$  non-critical AB
    - demonstration of its susceptibility to  $\geq 1$  critical AB
  - If lab analyses are not feasible (sampling or culture or susceptibility testing is difficult/impossible), literature data supporting the sole use of critical ABs must be provided.

# New Royal Decree regulating the use of drugs by Vets and Animal owners (MB/BS 29-07-2016)



CODA - CERVA



- **SPECIAL MEASURES** (continued)
  - In exceptional (emergency) cases, a critical AB may be administered to a single animal under the Vet's own responsibility :

- life-threatening stage of the disease or
- risk of irreversible sequelae.

Lab analyses remain due and treatment shall be adapted upon results' delivery

## Use of critical AB ?

- Very disuasive regulation
- Are situations where critical AB use is permitted realistic ?
- Will other « critical » or « last-resort » molecules later be merged to the list? (Colistine, Pleuromutilins, ...)

# About *E.coli* resistance to $\geq 5$ non-critical ABs ...

- EU standard  $\mu$ -dilution plate : 2016 MIC data

## SENSITITRE CUSTOM PLATE FORMAT

Plate Code: EUVSEC

Date: 29-Oct-13

1309201236

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SMX 1024	TMP 32	CIP 8	TET 64	MERO 16	AZI 64	NAL 128	CHL 128	TGC 8	COL 16	AMP 64	GEN 32
B	SMX 512	TMP 16	CIP 4	TET 32	MERO 8	AZI 32	NAL 64	CHL 64	TGC 4	COL 8	AMP 32	GEN 16
C	SMX 256	TMP 8	CIP 2	TET 16	MERO 4	AZI 16	NAL 32	CHL 32	TGC 2	COL 4	AMP 16	GEN 8
D	SMX 128	TMP 4	CIP 1	TET 8	MERO 2	AZI 8	NAL 16	CHL 16	TGC 1	COL 2	AMP 8	GEN 4
E	SMX 64	TMP 2	CIP 0.5	TET 4	MERO 1	AZI 4	NAL 8	CHL 8	TGC 0.5	COL 1	AMP 4	GEN 2
F	SMX 32	TMP 1	CIP 0.25	TET 2	MERO 0.5	AZI 2	NAL 4	FOT 1	TGC 0.25	TAZ 2	AMP 2	GEN 1
G	SMX 16	TMP 0.5	CIP 0.12	CIP 0.03	MERO 0.25	MERO 0.06	FOT 4	FOT 0.5	TAZ 8	TAZ 1	AMP 1	GEN 0.5
H	SMX 8	TMP 0.25	CIP 0.06	CIP 0.015	MERO 0.12	MERO 0.03	FOT 2	FOT 0.25	TAZ 4	TAZ 0.5	POS CON	POS CON

### ANTIMICROBICS

SMX	Sulfamethoxazole
TMP	Trimethoprim
CIP	Ciprofloxacin
TET	Tetracycline
MERO	Meropenem
AZI	Azithromycin
NAL	Nalidixic Acid
FOT	Cefotaxime
CHL	Chloramphenicol
TGC	Tigecycline
TAZ	Ceftazidime
COL	Colistin
AMP	Ampicillin
POS	Positive Control
GEN	Gentamicin

- In a panel of 1,073 indicator *E.coli* strains isolated non-specifically < pigs, cattle and poultry, **12 (1.1%)** do resist to  $\geq 5$  non-critical ABs and are sensitive to either FQ or CEPHA or both.
- In a panel of 483 ESBL-producing indicator *E.coli* strains isolated < pigs, cattle and poultry, 34 (7%) do resist to  $\geq 5$  non-critical ABs from which just **4 (0.8%)** are sensitive to FQ

## Use of critical AB ?

- Very disuasive regulation
- Are situations where critical AB use is permitted realistic ?
- Will other « critical » or « last-resort » molecules later be merged to the list? (Colistine, Pleuromutilins, ...)

- => Time to **Promote AB Susceptibility Testing (AST)** as a support to AB treatments ?!
- When is it relevant ?
- What is needed ?
- What is the future ?



# About the lab isolation of a disease-causing bacterium...



## ○ **FROM THE VETERINARY SIDE** : « GVP ! »

- Importance of the anamnesis / diagnostic
- Relevance & Quality of the samples sent to the laboratory
- Relevance of the requested analysis

SHARE DOUBTS ! DISCUSS ISSUES !  
ADAPT SAMPLING !  
REFINE / DOCUMENT DIAGNOSTIC !



### Examples of « BVP / BLP »:

- *Please conduct an AST on this swab ...*
- *Pullorose suspected, please confirm with the provided faeces ...*

## ○ **FROM THE LABORATORY SIDE** : « GLP ! »

- Tentative isolation of the disease-causing bacterium
- Identification of the pathogen + confirmation of the pathogenic potential if unsure
- Antibiotic Suceptibility testing



# Laboratory steps



- **Tentative isolation of the disease-causing bacterium and relevance of subsequent AST**
  - Highly specific enrichment / isolation media available (e.g. mobile *Salmonellae*, sporulating *Bacilli* / *Clostridia* ...) => isolation most probable, AST relevant
  - Semi- or Non-specific enrichment / isolation media available (*Streptococci*, *Pasteurellae*, *Salmonella Gallinarum* ...) => isolation probable, AST relevant
  - Enrichment / Isolation media available but slow or cumbersome growth (*Mycobacteria*, *Mycoplasmae*, *Leptospira*, *Brachyspira*...) => isolation hypothetical (expert labs only), AST not relevant
  - Bacterium is NOT culturable in free-living form (*Chlamydia*, *Rickettsia*, *Coxiella*, ...) => isolation highly challenging, AST not relevant

# Laboratory steps



## ○ How to deal with non-culturable bacteria ?

- Routine colony identification methods not relevant (MALDI-TOF MS), traditional AST impossible
- Molecular (PCR) testing to rule in / rule out suspicion (more expensive)
- Serological testing to rule in / rule out suspicion (requires additional blood sampling + seroconversion)
- => Recommended (Antibiotic?) treatment based on Best Practice, Litterature data, **up-to-date** Formularium
- Awaited new methodologies for routine use in the Veterinary Bacteriology lab : Whole Genome Sequencing of bacteriological colonies, Sample / Metagenome / Microbiome Sequencing, AB resistance genes ID or screening (DNA hybridization micro-arrays)



CODA - CERVA

# Laboratory issues (1/4)



- **The disease-causing bacterium is present and culturable but ...**
  - hides within a flora of identical commensals (e.g. *E.coli*)

## **DIAGNOSTIC OF ANIMAL COLIBACILLOSIS**

- ⇒ evidence for pathogenicity (*E.coli*) signatures needed (serotype, virulence factors, ...)
- ⇒ Molecular tests (PCR, hybridization  $\mu$ arrays)
- ⇒ Analyze bacterial pools

Drawbacks : analysis cost,  
need to analyze > 1 colony,  
delay



CODA - CERVA

## Laboratory issues (2/4)



- **The disease-causing bacterium is present and culturable but ...**
  - its presence is not necessarily a disease signature (opportunistic)

### **DIAGNOSTIC OF OPPORTUNISTIC INFECTIONS**

- ⇒ link bacteriological finding with animal condition
- ⇒ check for records / symptoms of primary infections

Drawbacks : delay, risk of disease misidentification



## Laboratory issues (3/4)



- **The disease-causing bacterium is present and culturable but ...**
  - is mixed with or inhibited by a bunch of other organisms (« polybacterial »)
    - ⇒ Improve lab enrichment / (re-)isolation methods if possible
    - ⇒ Shotgun identification of all colonies (MALDI-TOF)
    - ⇒ Molecular detection of suspected pathogen(s) on pooled colonies / unenriched sample

Drawbacks : delay, analysis cost



CODA - CERVA

# Laboratory issues (4/4)



- **The disease-causing bacterium is present and culturable but ...**
  - is present in very low quantities
    - ⇒ Optimize lab enrichment / (re-)isolation methods if possible
    - ⇒ Molecular detection of suspected pathogen(s) on unenriched sample

Drawbacks : delay, analysis cost



# Conclusions

## Use of Critical AB in animal productions strongly discouraged !

- very strict (unrealistic?) criteria (when AST is feasible)
- possibly more critical AB blacklisted in the future

## ○ Time to promote systematic lab (AST) support to (all) Ab treatments ?

- Critical importance of « GVP /GLP » !
- Bacteria culturability is one challenging laboratory issue
- True pathogenic nature of a bacterium is another one

## ○ Can modern technologies help ?

- Whole Genome sequencing for *in silico* AST (expert/ref labs so far)
- DNA micro-arrays for rapid screening of AB RES genes
- Whole sample (microbiome) sequencing for detecting pathogens and global « RESISTOME »
- Individual resistance profiling (whenever traditional or DNA based) still requires *strain isolation*



# QUESTIONS ?

National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance in animals at the  
**Veterinary & Agrochemical Research Institute (CODA-CERVA)**

## **Scientists**

Bénédicte Callens

Vicky Jasson

Cécile Boland

Jean-Baptiste Hanon, Estelle Méroc, Sarah Welby

## **Analysts**

Deborah Petrone

Alexandru Radu

Tiziano Fancello

