



RELAZIONE FINALE TEST INTERLABORATORIO PER LA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI 2013 PER GLI ISOLATI DI *ESCHERICHIA COLI*, *STAPHYLOCOCCUS SPP.* E *STREPTOCOCCUS SPP.*

1. INTRODUZIONE.....	1
2. MATERIALI E METODI	
2.1 Partecipanti.....	2
2.2 Isolati inviati, modalità di esecuzione ed interpretazione dei test.....	4
2.3 Invio dei risultati	5
2.4 Valutazione dei dati	6
3. RISULTATI	
3.1 <i>Escherichia coli</i>	8
3.2 <i>Staphylococcus spp</i>	10
3.3 <i>Streptococcus spp</i>	12
3.4 Risultati per Istituto partecipante.....	14
4. DISCUSSIONE.....	15
5. CONCLUSIONI.....	18

1. INTRODUZIONE

Gentili Colleghi, il Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza e National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance ha organizzato per l'anno 2013 un Test Interlaboratorio per i Saggi di Sensibilità agli Antibiotici su isolati dei seguenti agenti batterici patogeni animali: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*

Lo scopo del Test interlaboratorio è stato quello di monitorare la qualità dei dati prodotti dai laboratori IZS presenti sul territorio per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici e contestualmente di fornire, là dove necessario, un supporto tecnico-scientifico per i laboratori diagnostici (diagnostica degli agenti eziologici delle malattie batteriche animali, incluse alcune malattie zoonosiche). Tali attività si ritengono prioritarie nell'ambito delle funzioni di servizio come Centro di Referenza Nazionale.

Come è noto, l'isolamento dell'agente eziologico e la valutazione della sensibilità agli antibiotici è sempre più importante nella corretta gestione della diagnosi e della terapia con antibiotici, sia negli animali zootecnici che in quelli da compagnia.

L'orientamento corretto della terapia antibiotica a cura dei laboratori veterinari (specialmente se facenti parte del SSN, in Enti Sanitari di diritto pubblico come gli IZZSS), passa necessariamente per un'evidenza di validità delle prove e di una affidabilità e razionalità di quanto riportano nei loro rapporti di prova. La materia è sempre più attuale e delicata a causa dell'emergenza e della diffusione di resistenze e multiresistenze in agenti patogeni ed opportunisti degli animali, inclusi alcuni agenti zoonosici.



2. MATERIALI E METODI

2.1 Partecipanti

Nel corso del 2013 è stata inviata una comunicazione alle Direzioni di tutti gli IZZSS affinché indicassero le strutture che gestiscono la Diagnostica microbiologica delle mastiti, rappresentative delle diverse Regioni e Province Autonome di competenza, intenzionate a partecipare al Test Interlaboratorio per la Sensibilità agli Antibiotici. Dal 20 dicembre il CRN-AR ha reso disponibile un opportuno Web Service, al seguente link <http://195.45.99.81/CircuitiInterlaboratorioCRAB/register>, da cui i partecipanti potevano inviare la richiesta di registrazione. A tale richiesta seguiva una e-mail di conferma dell'avvenuta registrazione.

Le Strutture che hanno aderito sono risultate 19, di cui in elenco:

- Sezione di Reggio Emilia, IZS Lombardia Emilia-Romagna, Via Pitagora, 242124 Reggio Emilia (Ref. Dr. Andrea Luppi).
- Area Territoriale Catania, IZS Sicilia, Via Passo Gravina, 195 95125 Catania, (Ref. Dr. Antonio Selvaggio).
- IZS Mezzogiorno, Via Crotone 88100 Catanzaro (Ref. Dr. Caterina Rivero).
- Sezione di Piacenza, IZS Lombardia Emilia-Romagna, Strada della Faggiola, 1 29027 Gariga di Podenzano, Piacenza (Ref. Dr. Chiara Garbarino).
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Lavisotto, 129 38121 Trento (Ref. Debora Dellamaria).
- Sezione Territoriale di Bolzano (SCT6), IZS Venezie, Via Laura Conti, 4, 39100 Bolzano (Ref. Dr. Eva Robatscher).
- Sezione di Bologna, IZS Lombardia Emilia-Romagna, Via P. Fiorini, 5, 40127 Bologna (Ref. Dr. Giuseppe Merialdi)
- Sezione Territoriale di Padova (SCT3, Padova e Adria), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 35020 Legnaro Padova (Ref. Dr. Michela Corrà).
- Sezione Territoriale di Udine (SCT4 Friuli Venezia Giulia), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via della Roggia, 10 33030 Basaldella di Campofornido, Udine (Ref. Dr. Monia Cocchi).
- U.O. Diagnostica Generale (SC Foggia), Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata, Via Manfredonia, 20- 71121 Foggia (Ref. Dr. Pasquale Troiano).
- Settore Sanità Animale, Istituto Caporale Teramo, Via Campo Boario, 1 64100 Teramo (Ref. Dr. Piero Badagliacca).
- SS Diagnostica Generale, SC di Matera, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata Via della tecnica, 23 75100 Matera (Ref. Rosa Fraccalvieri).
- S.S. Laboratorio Benessere Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta- Via Bologna, 148 10154 Torino (Ref. Dr. Stefania Bergagna).
- S. C. Sanità Animale, Sede Centrale Sassari, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, via Duca degli Abruzzi, 8- 07100, Sassari (Ref. Dr. Stefano Lollai).
- IZS Umbria e Marche, Via G. Salvemini, 1, 06126 Perugia (Ref. Dr. Andrea Valiani).
- IZS Mezzogiorno, Via Salute, 2 80055 Portici Napoli (Ref. Dr. Anna Cerrone).



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Direzione Operativa Diagnostica Generale
Sede Centrale via Appia Nuova, 1411 - 00178 Roma



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

- Sezione Diagnostica di Brescia, IZS Emilia-Romagna Via A. Bianchi, 9 25124 Brescia (Ref. Dr. Giovanni Alborali).
- IZS Mezzogiorno Sezione Caserta Via A. Jervolino, 19 81100 Caserta (Ref. Dr. Antonella Pesce).
- IZS dell'Umbria e delle Marche, Via dei Canonici 140 Villa Fastiggi 1122 Pesaro (Ref. Dr. Piermario Mangili).

Di questi solo 18 partecipanti hanno inviato i risultati.



2.2 Isolati Inviati, modalità di esecuzione ed interpretazione dei test.

Per l'esecuzione del Test Interlaboratorio sono stati inviati 5 isolati di *Escherichia coli*, 5 di *Staphylococcus* spp., 5 di *Streptococcus* spp., il Manuale Utente del Portale Circuiti Interlaboratorio CRAB per l'invio dei risultati (Documento in Allegato) e gli isolati ATCC di riferimento.

Lo scopo del Test è stato quello di monitorare i laboratori diagnostici nell'ambito di una delle prove da loro svolte routinariamente. Si è ritenuto pertanto di lasciare che i partecipanti eseguissero i test con le metodiche ed il materiale normalmente impiegato per saggiare gli isolati "veri". Contestualmente, sono state inviate informazioni relative agli Standard Internazionali da seguire per avere evidenza di validità delle prove effettuate insieme ad un elenco "minimo" di molecole da testare per ogni gruppo di batteri ricevuti, sulle quali sarebbero state condotte le valutazioni e le analisi del test interlaboratorio. Tale elenco rappresenta un *panel* di molecole di chemio-antibiotici per le quali esiste uno Standard Interpretativo Internazionale valido, rappresentative di tutte le classi e sottoclassi di chemioantibiotici di cui esistono specialità veterinarie utilizzabili nell'approccio alla terapia delle mastiti.

Testare molecole rappresentative di classi e sottoclassi con il laboratorio diagnostico di riportare i test di sensibilità in modo valido, razionale ed efficiente, Gli esiti delle molecole rappresentative predicono infatti con adeguata accuratezza anche la sensibilità dell'agente nei confronti delle altre molecole della stessa classe/sottoclasse.

Un esempio di questo approccio ai test di sensibilità ed alla loro interpretazione, è disponibile nelle pagine WEB del Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (Linee Guida per l'interpretazione degli antibiogrammi) e può essere fornito ai veterinari pratici per orientare la scelta delle specialità veterinarie disponibili per la specie e la tipologia produttiva dell'animale da trattare:
http://195.45.99.82:800/Molecole_prototipo_e_loro_equivalenti_in_vitro_2013.pdf

Escherichia coli

Sono stati inviati 5 isolati di *Escherichia coli* (emolitici e non emolitici) nominati da EC2_1 a EC2_5. Gli isolati dovevano essere saggiati con le molecole di seguito elencate, secondo la procedura in uso presso il Laboratorio, o in alternativa secondo la procedura inviata dal CRN-AR. I risultati ottenuti dovevano essere interpretati e categorizzati secondo Standard CLSI VET01-02. Le tabelle di interpretazione del documento CLSI sono state inviate a chi ne ha fatto richiesta.

Molecole da testare: Ceftiofur/Cefotaxime; Amoxicillina+Ac.Clavulanico; Ampicillina; Cefazolina; Enrofloxacin; Gentamicina; Sulfisoxazolo; Trimetoprim+Sulfametox; Tetraciclina.

Qualora il laboratorio lo avesse ritenuto opportuno, gli isolati potevano essere saggiati anche mediante Test di Conferma fenotipica per ESBL ed il risultato ottenuto poteva essere inviato insieme agli altri risultati ma, tale prova, **era da considerarsi non obbligatoria.**



Staphylococcus spp.

Sono stati inviati 5 isolati di *Staphylococcus* spp. nominati da ST2_1 a ST2_5.

Gli isolati dovevano essere saggiati con le molecole di seguito elencate, secondo la procedura in uso presso il Laboratorio, o in alternativa secondo la procedura inviata dal CRN-AR. I risultati ottenuti dovevano essere interpretati e categorizzati secondo Standard CLSI VET01-02. Le tabelle di interpretazione del documento CLSI sono state inviate a chi ne ha fatto richiesta.

Molecole da testare: Ceftiofur/Cefotaxime; Amoxicillina+Ac.Clavulanico; Ampicillina; Cefalotina; Cloramfenicolo; Clindamicina; Enrofloxacin; Eritromicina; Gentamicina; Oxacillina; Sulfisoxazolo; Trimethoprim+Sulfametox; Tetraciclina.

Qualora il laboratorio lo avesse ritenuto opportuno gli isolati potevano essere saggiati anche mediante Test di Conferma per Meticillino-resistenza ed il risultato ottenuto poteva essere inviato insieme agli altri risultati ma, tale prova, **era da considerarsi non obbligatoria.**

Streptococcus spp.

Sono stati inviati 5 isolati di *Streptococcus* spp. nominati da STR2_1 a STR2_5.

Gli isolati dovevano essere saggiati con le molecole di seguito elencate, secondo la procedura in uso presso il Laboratorio, o in alternativa secondo la procedura inviata dal CRN-AR. I risultati ottenuti dovevano essere interpretati e categorizzati secondo Standard CLSI VET01-02. Le tabelle di interpretazione del documento CLSI sono state inviate a chi ne ha fatto richiesta.

Molecole da testare: Ceftiofur/Cefotaxime; Ampicillina; Clindamicina; Pirlimycin; Eritromicina; Tetraciclina; Penicillina-Novobiocina; Penicillina.

2.3 Invio dei risultati.

L'invio dei risultati è avvenuto attraverso l'applicativo web <http://195.45.99.81/CircuitiInterlaboratorioCRAB/register>.

Il Manuale di utilizzo dell'applicativo fornito è allegato al presente documento.

Ogni singolo laboratorio partecipante ha avuto accesso al portale del Circuito Interlaboratorio con apposita login e password, per poter visualizzare e scaricare i propri risultati nel dettaglio, e confrontare gli esiti ottenuti rispetto al valore di riferimento.



2.4 Valutazione dei dati

Per la produzione del Report sull'analisi dei dati ad ogni partecipante è stato attribuito un numero identificativo univoco che consentiva di mantenerne anonima l'identità.

I dati riportati dai laboratori sono stati analizzati sulla base del risultato categorizzato come Sensibile (S), Intermedio (I) e Resistente (R) e confrontati con il Valore Atteso (Valore di Riferimento).

Definizioni

Accuratezza: un risultato qualitativo si considera accurato quando è lo stesso del Valore Atteso.

Accuratezza (%): è il rapporto (%) tra il totale degli esiti concordi con il valore di riferimento e il totale degli esiti ottenuti.

Per gli scopi dell'interpretazione dei dati ottenuti nel Test Interlaboratorio, si riportano di seguito le diverse definizioni di **Percentuale di Accuratezza** applicate nell'elaborazione dei dati:

Accuratezza (%) per agente

E' il rapporto espresso in % tra la somma dei risultati concordi con il valore di riferimento e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per tutti gli isolati del singolo gruppo di agenti.

Accuratezza (%) per antibiotico

E' il rapporto espresso in % tra la somma dei risultati concordi con il valore di riferimento e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti i laboratori partecipanti per singolo isolato, per singolo antibiotico.

Accuratezza (%) per isolato

E' il rapporto espresso in % tra la somma dei risultati concordi con il valore di riferimento e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per tutti i laboratori partecipanti per singolo isolato.

Accuratezza (%) per partecipante per agente

E' il rapporto espresso in % tra la somma dei risultati concordi con il valore di riferimento e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per singolo laboratorio partecipante per agente.

La discordanza tra il risultato ottenuto e il Valore Atteso può generare uno dei seguenti Errori:

Very Major Error: il risultato ottenuto è Sensibile, ma il Valore Atteso è Resistente.

Major Error: il risultato ottenuto è Resistente, ma il Valore Atteso è Sensibile.

Minor Error: è la misclassificazione tra Sensibile ed Intermedio, o tra Resistente ed Intermedio.

Per gli scopi dell'interpretazione dei dati ottenuti, e per semplificare la lettura del Report, tale tipologia di Errori verrà analizzata in modo cumulativo, in termini di **Errore %** (Frazione o percentuale complementare di accuratezza %).



Errore (%) per agente

E' il rapporto espresso in % tra la somma degli Errori (risultati discordanti rispetto al valore di riferimento) e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per tutti gli isolati del singolo gruppo di agenti.

Errore (%) per antibiotico

E' il rapporto espresso in % tra la somma degli Errori (risultati discordanti rispetto al valore di riferimento) e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti i laboratori partecipanti per singolo isolato, per singolo antibiotico.

Errore (%) per isolato

E' il rapporto espresso in % tra la somma degli Errori (risultati discordanti rispetto al valore di riferimento) e la somma di tutti i risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per tutti i laboratori partecipanti per singolo isolato.

Errore (%) per partecipante per agente

E' il rapporto espresso in % tra la somma degli Errori (risultati discordanti rispetto al valore di riferimento) e la somma dei risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per tutti gli isolati per singolo agente per singolo laboratorio partecipante.

Accettabilità.

Si considera "accettabile" una Accuratezza (%) $\geq 90\%$.

Di conseguenza si ritiene accettabile una % di Errore non superiore al 10%.



3. RISULTATI

3.1 *Escherichia coli*

Tutti i partecipanti hanno eseguito il Test di sensibilità agli antibiotici sugli isolati di *Escherichia coli* con la metodica di Disk Diffusion.

Dei 18 partecipanti che hanno inviato i risultati, solo 8 hanno eseguito il Test su tutti gli isolati con tutte le molecole indicate, ciò ha determinato una difficoltà aggiuntiva nella elaborazione dei risultati, poiché alcuni partecipanti hanno fornito i risultati per un numero inferiore di molecole rispetto a quelle indicate, in alcuni casi anche solo 4 molecole per isolato.

Nessun partecipante ha eseguito il test di conferma fenotipica per ESBL.

Per quanto riguarda l'analisi dei risultati si è ritenuto opportuno non includere quelli ottenuti per la Cefazolina, in quanto nel nuovo Documento CLSI VET 01-02, 2013, rispetto al precedente (M31-A3, 2010), sono cambiati i criteri di interpretazione, e i partecipanti potevano non aver avuto il tempo necessario per disporre la validazione della combinazione agente/cefazolina.

I risultati elaborati vengono mostrati come di seguito:

- Accuratezza % per isolato (Tabella 1).
- Errori % per partecipante (Grafico 1).

	EC2_1	EC2_2	EC2_3	EC2_4	EC2_5	Totale
Risultati corretti	115	119	118	97	108	557
Totale risultati	128	128	127	127	128	638
Accuratezza (%) per isolato	89,84	92,97	92,91	76,38	84,38	87,30

Tabella 1. Accuratezza % per isolato di *Escherichia coli*

Di seguito si riportano i risultati nel dettaglio.

Per l'isolato EC2_1, 7 partecipanti su 18 (38,8%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 8 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >80%, mentre 3 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 70 ed il 75%.

Per l'isolato EC2_2, 9 partecipanti su 18 (50%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 8 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >80%, mentre 1 partecipante su 18 ha ottenuto una accuratezza del 75%.

Per l'isolato EC2_3, 11 partecipanti su 18 (61,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 5 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >80%, mentre 2 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza del 75%.

Per l'isolato EC2_4, 2 partecipanti su 18 (11,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 7 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >80%, mentre 9 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 37,5% ed il 75%.

Per l'isolato EC2_5, 2 partecipanti su 18 (11,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 13 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >80%, mentre 3 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 75% ed il 50%.

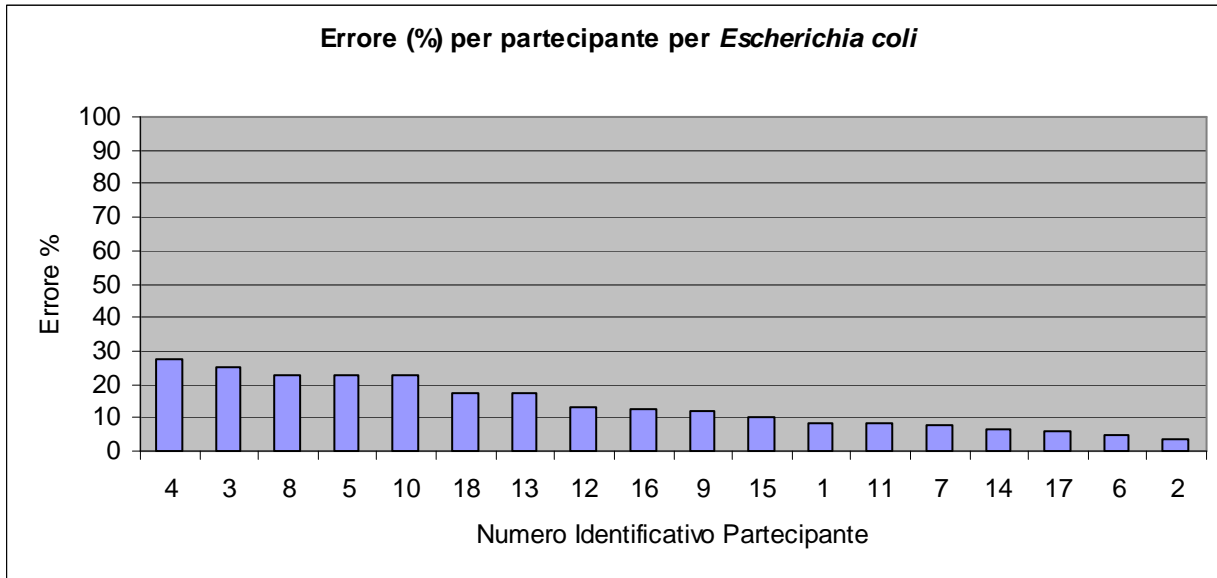


Grafico 1. Errori (%) per partecipante per *Escherichia coli*

I risultati ottenuti mostrano che:

- 8 partecipanti su 18 (44,4%) hanno ottenuto una % di Errori \leq 10%:partecipanti N° 2, 6, 17, 14, 7, 11, 1, 15;
- 5 partecipanti su 18 (27,7%) hanno ottenuto una % di Errori compresa tra il 10,1% ed il 20%: partecipanti N° 9, 16, 12, 13, 18;
- 5 partecipanti su 18 (27,7%), hanno ottenuto una % di Errori superiore al 20%: partecipanti N° 10, 5, 8, 3, 4.

3.2 *Staphylococcus* spp.

Tutti i partecipanti hanno eseguito il Test di sensibilità agli antibiotici sugli isolati di *Staphylococcus* spp. con la metodica di Disk Diffusion.

Dei 18 partecipanti che hanno inviato i risultati, solo 8 hanno eseguito il Test su tutti gli isolati con tutte le molecole indicate, ciò ha determinato una difficoltà aggiuntiva nella elaborazione dei risultati, poiché alcuni partecipanti hanno fornito i risultati per meno molecole rispetto a quelle indicate, in alcuni casi anche solo 5 per isolato inviato. Due laboratori non eseguono di routine il test di sensibilità all'oxacillina o alla cefoxitina.

Nessun partecipante ha eseguito il test di conferma per la resistenza all'oxacillina (per valutare la presenza di *Staphylococcus* meticillino-resistenti).

I risultati elaborati vengono mostrati in due modi:

-Accuratezza % per isolato (Tabella 2).

-Errori % per partecipante (Grafico 2).

	ST2_1	ST2_2	ST2_3	ST2_4	ST2_5	Totale
Risultati corretti	188	189	192	169	195	933
Totale risultati	204	204	204	204	204	1020
Accuratezza (%) per isolato	92,16	92,65	94,12	82,84	95,59	91,47

Tabella 2. Accuratezza % per isolato di *Staphylococcus* spp.

Di seguito si riportano i risultati nel dettaglio.

Per l'isolato ST2_1, 8 partecipanti su 18 (44,4%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 7 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >90%, 3 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 53,85% e l'88,89%.

Per l'isolato ST2_2, 8 partecipanti su 18 (44,4%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 5 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >90%, 5 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 69,2% e l'88,9%.

Per l'isolato ST2_3, 13 partecipanti su 18 (72,2%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >90%, 3 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 60% ed il 76,9%.

Per l'isolato ST2_4, 2 partecipanti su 18 (11,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 5 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >90,0%, 11 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 61,5% e l'84,62%.

Per l'isolato ST2_5, 14 partecipanti su 18 (77,7%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza >90,0%, 2 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza rispettivamente del 61,5% e dell'81,8%.

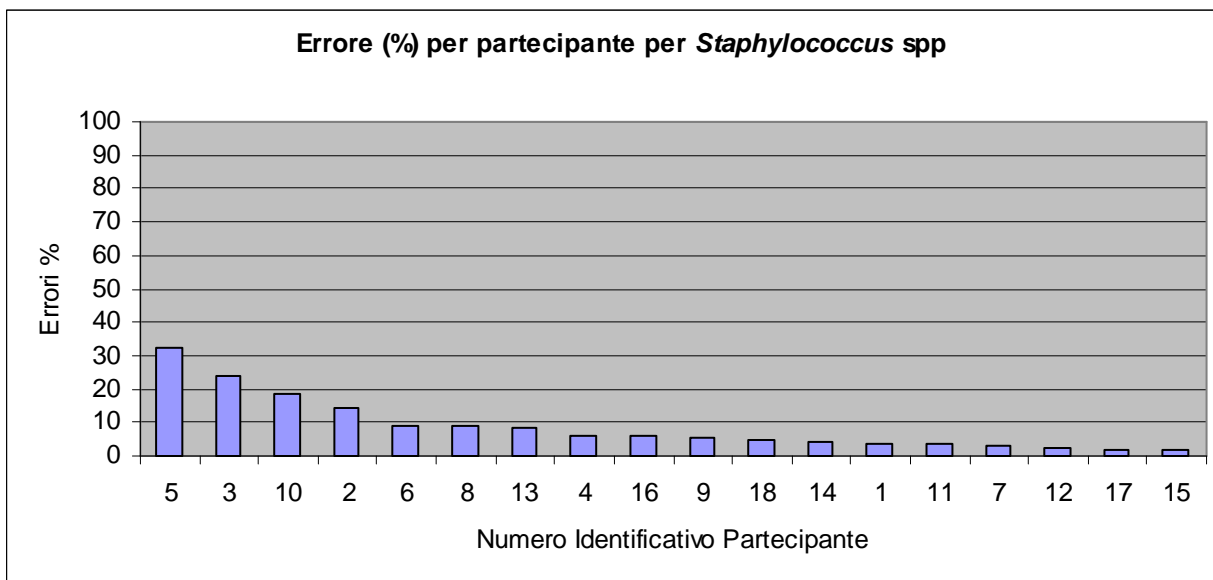


Grafico 2. Errori (%) per partecipante per *Staphylococcus* spp.

I risultati ottenuti mostrano che:

- 14 partecipanti su 18 (77,8%) hanno ottenuto una % di Errori $\leq 10\%$:partecipanti N° 15, 17, 12, 7, 11, 1, 14, 18, 9,16, 4, 13, 8, 6;
- 2 partecipanti su 18 (11,1%) hanno ottenuto una % di Errori compresa tra il 10,1% ed il 20%: partecipanti N° 2, 10;
- 2 partecipanti su 18 (11,1%) hanno ottenuto una % di Errori superiore al 20%: partecipanti N° 3, 5.

3.3 Streptococcus spp.

Tutti i partecipanti hanno eseguito il Test di sensibilità agli antibiotici sugli isolati di *Streptococcus* spp. con la metodica di Disk Diffusion.

Dato il basso numero di partecipanti che hanno eseguito il test con le molecole Pirlimicina e la combinazione di Penicillina-Novobiocina, si è deciso di non includere nell'analisi i risultati relativi a questi antibiotici.

Dei 18 partecipanti che hanno inviato i risultati, solo otto hanno eseguito il Test su tutti gli isolati con tutte le molecole indicate, ciò ha determinato una difficoltà aggiuntiva nella elaborazione dei risultati, poiché alcuni partecipanti hanno fornito i risultati per meno molecole rispetto a quelle indicate, in alcuni casi anche solo 6 per isolato inviato.

I risultati elaborati vengono mostrati in due modi:

-Accuratezza % per isolato (Tabella 3).

-Errori % per partecipante (Grafico 3).

	STR2_1	STR2_2	STR2_3	STR2_4	STR2_5	Totale
Risultati corretti	78	73	83	81	88	403
Totale risultati	92	92	90	92	90	456
Accuratezza (%) per isolato	84,78	79,35	92,22	88,04	97,78	88,38

Tabella 3. Accuratezza % per isolato di *Streptococcus* spp.

Di seguito si riportano i risultati nel dettaglio.

Per l'isolato STR2_1, 5 partecipanti su 18 (27,7%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 9 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$, 4 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 50% ed il 75%.

Per l'isolato STR2_2, 5 partecipanti su 18 (27,7%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 4 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$, 9 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza compresa tra il 50% ed il 75%.

Per l'isolato STR2_3, 13 partecipanti su 17 (76,5%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 17 hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$, 2 partecipanti su 17 hanno ottenuto una accuratezza del 66,67% e del 50% rispettivamente.

Un partecipante non ha inviato alcun risultato per questo isolato.

Per l'isolato STR2_4, 11 partecipanti su 18 (61,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 3 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$, 4 partecipanti su 18 hanno ottenuto una accuratezza del 50%.

Per l'isolato STR2_5, 15 partecipanti su 17 (88,2%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 17 hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$.

Un partecipante non ha inviato alcun risultato per questo isolato.

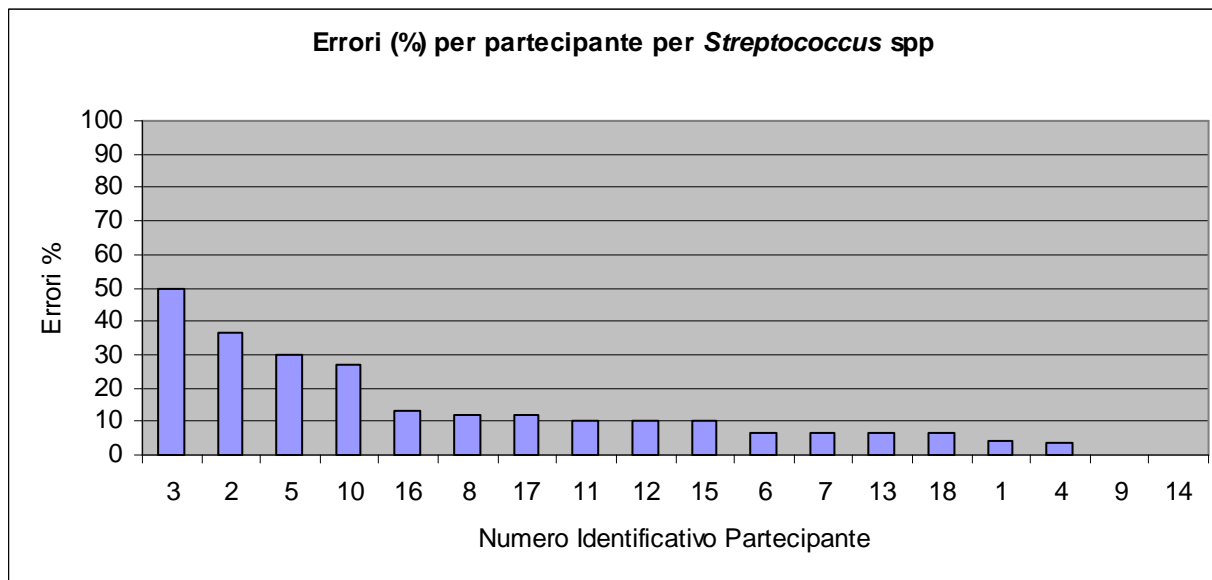


Grafico 3. Errori (%) per partecipante per *Streptococcus* spp.

I risultati ottenuti mostrano che:

-2 partecipanti su 18 (11,1%) non hanno commesso nessun errore: partecipanti N° 14, 9;

-9 partecipanti su 18 (50%) hanno ottenuto una % di Errori $\leq 10\%$: partecipanti N° 4, 1, 18, 13, 7, 6, 15, 12, 11;

-3 partecipanti su 18 (16,7%) hanno ottenuto una % di Errori compresa tra il 10,1% ed il 20%: partecipanti N° 17, 8, 16;

-4 partecipanti su 18 (22,2%) hanno ottenuto una % di Errori superiore al 20%: partecipanti N° 10, 5, 2, 3.



3.4 Risultati per Struttura partecipante

Il livello di accuratezza % dei 18 partecipanti è riportato in Tabella 4 (pagina 20), in particolare:

- 6 partecipanti su 18 (33,3%) hanno raggiunto un livello di accuratezza % $\geq 90\%$ per tutti gli agenti proposti.
- 6 partecipanti su 18 (33,3%) hanno raggiunto un livello di accuratezza % $\geq 90\%$ per due dei tre agenti proposti.
- 3 partecipanti su 18 (16,6%) hanno ottenuto un livello di accuratezza % $\geq 90\%$ per uno dei tre agenti proposti.
- 3 partecipanti su 18 (16,6%) hanno ottenuto un livello di accuratezza % $\geq 90\%$ per nessuno dei tre agenti proposti.



DISCUSSIONE

Un'analisi generale dei risultati evidenzia che il livello percentuale di Errori avuto per *E. coli* e *Streptococcus* spp. è superiore rispetto a quello per *Staphylococcus* spp. (accuratezza % per agente 87,3 % e 88,38% vs 91,47% rispettivamente).

Tuttavia si osservano Errori % per agente diversi tra i vari laboratori partecipanti, con alcuni di essi che non raggiungono livelli soddisfacenti (accettabilità $\geq 90\%$). In particolare, più del 50% dei partecipanti non raggiunge i livelli di accuratezza (%) attesi per l'agente *E. coli*, e quasi il 40% per l'agente *Streptococcus* spp.

Dall'analisi dei dati per *E. coli*, in alcuni casi è stato possibile ricondurre gli Errori % per agente a specifiche combinazioni isolato-antibiotico.

In generale, le più basse percentuali di accuratezza per antibiotico sono state ottenute per molecole quali Ampicillina e Amoxicillina+Ac. Clavulanico. In alcuni casi sono stati riportati valori dei diametri di inibizione molto piccoli (es. 0 mm o 6 mm), quindi interpretati come Resistenti, in isolati il cui Valore Atteso era invece Sensibile.

L'isolato che ha dato i risultati più discordanti rispetto all'atteso è stato il EC2_4, che pur avendo come Valore Atteso la Sensibilità per tutte le molecole del panel proposto, ha ottenuto una percentuale di accuratezza pari al 74%, con la maggior parte degli errori classificati come Major Errors.

Per l'isolato EC2_1 sono stati riscontrati basse percentuali di accuratezza (61,1%) anche per la molecola Enrofloxacin, il cui Valore Atteso era Intermedio (Minor Error).

Di rilievo è stata la percentuale di accuratezza % per antibiotico ottenuta per le molecole Ceftiofur/Cefotaxime, che è risultata del 90,7%, valore che pur essendo accettabile per gli scopi del Test, lascia aperto il problema della corretta classificazione degli isolati di *E. coli* (ed altre Enterobacteriaceae) come Sensibili o Resistenti alle cefalosporine di terza/quarta generazione, antibiotici classificati di Importanza Critica (Critically Important Antimicrobials, WHO, 2008). L'accuratezza dell'esito del laboratorio per tali molecole è infatti vitale per la valutazione complessiva del "resistotipo" dell'agente, sia per scopi di servizio diagnostico (corretto orientamento della terapia) che per scopi di Sanità Pubblica Veterinaria (uso razionale e prudente dei farmaci antibiotici nel settore Veterinario).

Dall'analisi dei dati per *Staphylococcus* spp., per tutti gli isolati, tranne uno (ST2_4), non è stato possibile ricondurre gli Errori % per agente a combinazioni specifiche relative ad un particolare isolato o antibiotico, e gli stessi rientrano presumibilmente nell'ambito di problematiche tecniche o metodologiche del singolo laboratorio partecipante.

L'isolato ST2_4 ha ottenuto una accuratezza (%) per isolato dell'82,8%.

Nell'ambito del panel che doveva essere testato per gli isolati di *Staphylococcus* spp. per la classe di antibiotici beta-lattamici era stato espressamente richiesto di effettuare le determinazioni di sensibilità per:

- ampicillina
- oxacillina
- amoxicillina+Ac. Clavulanico



-cefalotina

-cefalosporina di terza generazione (ceftiofur o cefotaxime).

Per una qualsiasi delle molecole testate per la classe dei beta-lattamici, ad eccezione che per l'ampicillina e la cefalotina, a fronte di un risultato interpretabile come Resistente o Intermedio, si sarebbe dovuto sospettare di essere in presenza di un MRS (*Staphylococcus Meticillino Resistente*).

Questo isolato era effettivamente un MRSA, ma dei 18 laboratori partecipanti, 3 hanno misclassificato l'isolato commettendo un Very Major Error per la molecola Oxacillina, mentre due partecipanti non hanno testato questa molecola, apparentemente in quanto l'Oxacillina non rientra tra le molecole di screening sugli isolati saggiati di routine.

Dei 13 partecipanti che hanno ottenuto un esito concorde per la molecola Oxacillina, tutti tranne 2 hanno misclassificato gli esiti per tutte le altre molecole della classe dei beta-lattamici, che, secondo lo Standard di riferimento, avrebbero dovuto essere interpretati come Resistenti. In sostanza, hanno correttamente individuato la Resistenza all'Oxacillina, ma non hanno applicato quanto riportato nello Standard del Clinical Laboratory Standard Institute (VET 01-S2, CLSI), fornito come metodo Standard nei Materiali e Metodi (isolato da riportare come resistente a TUTTI i beta-lattamici).

Tale risultato pone l'accento sulla difficoltà che hanno alcuni laboratori nell'individuare e riportare correttamente il profilo di sensibilità di agenti multiresistenti emergenti quali MRSA. Tale difficoltà sembra risiedere in parte nell'applicazione della corretta metodologia di laboratorio ed in parte nella non corretta interpretazione dei risultati di sensibilità agli antibiotici beta-lattamici per *Staphylococcus aureus* ed altri *Staphylococci* secondo gli Standard correnti.

Metodologia e criteri interpretativi meritano sicuramente particolare attenzione nei laboratori diagnostici, specialmente allorché attraverso gli esiti dei test di sensibilità su isolati "clinici", si condiziona la scelta terapeutica del veterinario di campo.

Dall'analisi dei dati per *Streptococcus spp.*, per tutti gli isolati, tranne che per due (STR2_1 e STR2_2, non è stato possibile ricondurre gli Errori % per agente a combinazioni specifiche relative ad un particolare isolato o antibiotico, e gli stessi rientrano presumibilmente nell'ambito di problematiche tecniche o metodologiche del singolo laboratorio partecipante.

Per quanto riguarda le molecole appartenenti alla famiglia dei beta-lattamici, nell'ambito del panel che doveva essere testato, era stato espressamente richiesto di effettuare le determinazioni di sensibilità per:

-ampicillina

-penicillina

-cefalosporina di terza generazione (ceftiofur o cefotaxime).

I risultati di accuratezza % per antibiotico per queste molecole è stata del 92,6% che, pur essendo un risultato accettabile per gli scopi di questo circuito, solleva ancora la questione della corretta interpretazione delle resistenze nei confronti di questa importante classe di antibiotici.

In particolare 6 laboratori su 18 (33,33%), hanno fornito risultati discordanti per le suddette tre molecole su un stesso isolato testato (es. Penicillina: S; Ampicillina: R; Cefotaxime: S per STR2_1, oppure Penicillina: R; Ampicillina: S; Cefotaxime: S per STR2_).

Per quanto riguarda l'analisi dei risultati per la combinazione antibiotico/isolato Clindamicina/STR2_1, ed Eritromicina/STR2_2, l'accuratezza % per antibiotico è risultata inferiore al 35%. Questo in parte potrebbe essere spiegato dal fatto che non molti laboratori dichiarano di utilizzare molecole "class-representative" (secondo Standard) come la Clindamicina (6 su 14



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana**

Direzione Operativa Diagnostica Generale
Sede Centrale via Appia Nuova, 1411 - 00178 Roma



**Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza**

laboratori rispondenti, pari al 43%) per gli esami di routine. Per quanto riguarda l'Eritromicina, “class-representative” dei macrolidi (utilizzata nella routine da 11 su 14 laboratori rispondenti), potrebbe trattarsi di problemi tecnici o metodologici.



5 CONCLUSIONI

In conclusione, il Test Interlaboratorio per i Saggi di Sensibilità agli Antibiotici 2013 ha messo in evidenza capacità, entusiasmo ed attitudine dei laboratori afferenti alle varie Strutture degli IZZSS ad agire secondo i principi e le modalità del networking in Sanità Animale e Sanità Pubblica Veterinaria.

Per gli scopi di questo circuito, tra le note assolutamente positive, è da sottolineare le performance complessive del network, che possono essere valutate come accettabili. Infatti, complessivamente le % di Errori sono risultate inferiori al 10% per l'agente *Staphylococcus* spp., e non molto superiori al 10% per gli agenti *E. coli* e *Streptococcus* spp. Tuttavia, si è riscontrata una variabilità accentuata nell'attitudine dei vari laboratori a fornire esiti accurati, con alcune situazioni in cui i livelli di accuratezza attesi non sono stati raggiunti da vari partecipanti.

Per quanto riguarda i risultati discordanti, in molti casi non è stato possibile ricondurre gli Errori commessi dai singoli partecipanti a specifiche motivazioni, e gli stessi rientrano verosimilmente nell'ambito di problematiche tecniche o metodologiche del laboratorio che ha effettuato le prove.

Un problema specifico comune a più laboratori è stato riscontrato nella capacità dei partecipanti (specialmente per *E. coli* /*Enterobacteriaceae* e per *Staphylococcus aureus*) di individuare e classificare correttamente la resistenza ai beta-lattamici, incluse le cefalosporine di terza/quarta generazione. Per questa classe di farmaci, si ricorda che l'utilizzo per la terapia individuale nelle specie per le quali ne è consentito l'uso, dovrebbe essere limitata ai casi in cui l'agente batterico causa di malattia non risulta sensibile ad altre classi di antibiotici (Conclusioni del Consiglio dell'Unione Europea, 2012/C 211/02, GUUE, 18.7.2012).

E' da notare inoltre che sempre più frequentemente i suddetti agenti patogeni si presentano negli allevamenti zootecnici come agenti multi-resistenti (resistenti ad almeno 3-4 classi diverse di antibiotici) e pertanto la corretta determinazione del profilo di sensibilità diviene sempre più uno strumento indispensabile per il veterinario pratico necessario ad orientare la terapia in modo razionale, efficiente e nel rispetto dei principi di prudenza dell'uso degli antibiotici nel settore veterinario.

Nel fornire un feedback ai laboratori partecipanti, questo punto merita di essere sottolineato, sia per le possibili implicazioni nella routine diagnostica relative alla salute degli animali, errori di refertazione possono infatti favorire un approccio terapeutico inefficace, sia per i possibili rischi di Sanità Pubblica Veterinaria, connessi al fallimento nell'individuazione di *Staphylococci* meticillino-resistenti o *Enterobatteri* resistenti alle cefalosporine di terza/quarta generazione. .

Il livello di accuratezza ottenuto per singolo partecipante ed in generale il risultato del circuito saranno comunque da stimolo per un miglioramento continuo della capacità di esecuzione ed interpretazione dei test di sensibilità agli antibiotici. In alcuni casi, qualora ritenuto necessario dal laboratorio, i risultati del test potrebbero portare all'attuazione di un nuovo percorso di validazione del processo diagnostico, seguendo le indicazioni degli standard di riferimento, sia per quanto riguarda i metodi, che i criteri interpretativi. Il CRN-AR resta comunque disponibile a fornire tutto il supporto necessario per interpretare e risolvere specifiche problematiche.

In quest'ottica i laboratori possono contattare il CRN-AR per discutere dei risultati ottenuti per singolo laboratorio e sono altresì invitati a fornire eventuali suggerimenti ed osservazioni per il miglioramento dei Test Interlaboratorio che il CRN-AR proporrà nei prossimi anni.



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana**

Direzione Operativa Diagnostica Generale
Sede Centrale via Appia Nuova, 1411 - 00178 Roma



CRAB
Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

In conclusione, con la speranza di aver offerto uno strumento pratico ed utile agli obiettivi di Sanità Animale e di Sanità Pubblica Veterinaria perseguiti dagli IZZSS, confidiamo di poter fornire tale opportunità anche nel prossimo futuro ed in maniera periodica a tutti i laboratori che degli IZZSS che vorranno partecipare.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

Direzione Operativa Diagnostica Generale
Sede Centrale via Appia Nuova, 1411 - 00178 Roma



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

Numero Identificativo Partecipante	Risultati ottenuti per <i>Streptococcus spp</i>				Risultati ottenuti per <i>E. coli</i>				Risultati ottenuti per <i>Staphylococcus spp</i>			
	Esiti concordi	Esiti totali	Accuratezza (%) per agente	Errore (%) per agente	Esiti concordi	Esiti totali	Accuratezza (%) per agente	Errore (%) per agente	Esiti concordi	Esiti totali	Accuratezza (%) per agente	Errore (%) per agente
1	24	25	96,00	4,00	32	35	91,43	8,57	53	55	96,36	3,64
2	19	30	63,33	36,67	29	30	96,67	3,33	47	55	85,45	14,55
3	3	6	50,00	50,00	15	20	75,00	25,00	19	25	76,00	24,00
4	29	30	96,67	3,33	29	40	72,50	27,50	61	65	93,85	6,15
5	7	10	70,00	30,00	32	40	80,00	20,00	44	65	67,69	32,31
6	28	30	93,33	6,67	38	40	95,00	5,00	59	65	90,77	9,23
7	28	30	93,33	6,67	38	40	95,00	5,00	63	65	96,92	3,08
8	22	25	88,00	12,00	29	35	82,86	17,14	41	45	91,11	8,89
9	25	25	100,00	0,00	29	33	87,88	12,12	52	55	94,55	5,45
10	22	30	73,33	26,67	34	40	85,00	15,00	53	65	81,54	18,46
11	27	30	90,00	10,00	32	35	91,43	8,57	58	60	96,67	3,33
12	18	20	90,00	10,00	26	30	86,67	13,33	44	45	97,78	2,22
13	28	30	93,33	6,67	29	35	82,86	17,14	55	60	91,67	8,33
14	20	20	100,00	0,00	28	30	93,33	6,67	43	45	95,56	4,44
15	27	30	90,00	10,00	36	40	90,00	10,00	64	65	98,46	1,54
16	26	30	86,67	13,33	35	40	87,50	12,50	61	65	93,85	6,15
17	22	25	88,00	12,00	33	35	94,29	5,71	54	55	98,18	1,82
18	28	30	93,33	6,67	33	40	82,50	17,50	62	65	95,38	4,62

Tabella 4. Risultati complessivi per le 18 Strutture partecipanti.