



## RELAZIONE FINALE TEST INTERLABORATORIO PER LA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI 2014 PER GLI ISOLATI DI *ESCHERICHIA COLI* .

---

---

1. INTRODUZIONE.....	1
2. MATERIALI E METODI	
2.1 Partecipanti.....	2
2.2 Isolati inviati, modalità di esecuzione ed interpretazione dei test.....	3
2.3 Invio dei risultati .....	3
2.4 Valutazione dei dati .....	4
3. RISULTATI.....	5
3.1 Accuratezza (%) per isolato.....	6
3.2 Errori (%) per partecipante.....	7
3.3 Risultati per Struttura partecipante.....	8
4. DISCUSSIONE.....	9
5. CONCLUSIONI.....	9

---

---

### 1. INTRODUZIONE

Gentili Colleghi, il Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza e National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance ha organizzato per l'anno 2014 un Test Interlaboratorio per i Saggi di Sensibilità agli Antibiotici su isolati di *Escherichia coli*.

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 di laboratori 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 2014 è stata inviata una comunicazione alle Direzioni di tutti gli IZZSS affinché indicassero le strutture che gestiscono la Diagnostica microbiologica, rappresentative delle diverse Regioni e Province Autonome di competenza, intenzionate a partecipare al Test Interlaboratorio per la Sensibilità agli Antibiotici.

Le Strutture che hanno aderito sono risultate 16, di cui in elenco:

- Sezione di Reggio Emilia, IZS Lombardia Emilia-Romagna, Via Pitagora, 242124 Reggio Emilia (Ref. Dr. Andrea Luppi).
- Area Barcellona Pozzo di Gotto IZS Sicilia, Via S. Andrea, 96 98051 Messina (Ref. Dr. Elena Rappazzo).
- Sezione Territoriale di Bolzano (SCT1), IZS Venezia, Via Fiume, 78, 36100 Vicenza ( Ref. Antonio Barberio).
- Sezione Territoriale di Bolzano (SCT6), IZS Venezia, Via Laura Conti, 4, 39100 Bolzano (Ref. Dr. Dorotea Lombardo).
- 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 Venezia, Viale dell'Università, 10 35020 Legnaro Padova (Ref. Dr. Salvatore Catania).
- Sezione Territoriale di Udine (SCT4 Friuli Venezia Giulia), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezia, 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. Giovanni Foschi).
- 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. Alessandro Dondo).
- Sezione Diagnostica di Brescia, IZS Emilia-Romagna Via A. Bianchi, 9 25124 Brescia (Dr. Giovanni Alborali).
- IZS dell'Umbria e delle Marche, Via dei Canonici 140 Villa Fastiggi 1122 Pesaro (Ref. Dr. Piermario Mangili).
- IZS del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Strade da congiunte destre snc- 04100 Latina (Ref. Dr Gianpaolo Bruni)
- IZS del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Via Castelpulci- 50010 S. Martino alla Palma, Firenze (Ref. Dr Franco Corrias)
- IZS Umbria e Marche, Via G. Salvemini, 1, 06126 Perugia (Ref. Dr. Andrea Valiani).

**Di questi solo 14 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* nominati da EC3\_1 a EC3\_5.

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 batterici oggetto della loro attività diagnostica.

**Contestualmente, sono state inviate informazioni relative agli Standard Internazionali da seguire per avere evidenza di validità delle prove effettuate, ed un elenco “minimo” di molecole da testare per ogni gruppo di batteri ricevuti, sulle quali sarebbero state condotte le valutazione e le analisi dei dati del test interlaboratorio.**

Molecole rappresentative di classi e subclassi consentono al laboratorio diagnostico di riportare i test di sensibilità in modo valido, razionale ed efficiente, Gli esiti delle molecole rappresentative predicono infatti con accuratezza adeguata anche la sensibilità dell'agente nei confronti delle altre molecole della stessa classe o subclasse.

Infatti, le molecole rappresentative sono quelle molecole incluse negli Standard Internazionali (es. CLSI) e raccomandate per l'esecuzione dei test di sensibilità nei confronti di agenti batterici patogeni isolati da animali.

Sono inoltre le uniche per le quali sono disponibili range di sensibilità dei ceppi di riferimento utilizzati nel processo di validazione del test e di valutazione periodica della validità del metodo, e relativi valori di interpretazione delle prove di sensibilità (breakpoints per Sensibile, Intermedio, Resistente).

Pertanto costituiscono molecole sulle quali il CRN ha da alcuni anni impostato una piattaforma “consigliata” alla rete degli IZZSS, allo scopo di armonizzare un panel “minimo” di molecole da testare per gli agenti batterici considerati.

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](http://195.45.99.82:800/Molecole_prototipo_e_loro_equivalenti_in_vitro_2013.pdf)

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; Trimethoprim+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.**



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

### **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 disponibile sul portale del Circuito Interlaboratorio. Ogni singolo laboratorio partecipante ha avuto accesso nel portale del Circuito Interlaboratorio con la propria login e password per poter visualizzare i propri risultati di dettaglio, con gli esiti ottenuti rispetto al valore di riferimento, resi disponibili per il download.



## **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**

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**

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

Dei 14 partecipanti che hanno inviato i risultati, 10 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.

Solo un partecipante ha eseguito il test di conferma fenotipica per ESBL.

Per quanto riguarda l'analisi dei risultati si è ritenuto necessario non includere quelli ottenuti per la Cefazolina e per Amoxicillina-Ac Clavulanico.

I risultati elaborati vengono mostrati come di seguito elencato:

3.1 Accuratezza (%) per isolato.

3.2 Errori (%) per partecipante.

3.3 Risultati per Struttura partecipante



### **3.1 Accuratezza (%) per isolato.**

I risultati ottenuti sono mostrati in Tabella 1 e vengono di seguito riportati nel dettaglio.

Per l'isolato EC3\_1, 6 partecipanti su 14 (42.8%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 7 partecipanti su 14 hanno ottenuto una accuratezza  $\geq 80\%$ , mentre 1 partecipante ha ottenuto una accuratezza del 67%.

Per l'isolato EC3\_2, 12 partecipanti su 14 (86.7%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 1 partecipante ha ottenuto una accuratezza  $>80\%$ , mentre 1 partecipante ha ottenuto una accuratezza inferiore del 71.43%.

Per l'isolato EC3\_3, 12 partecipanti su 14 (86.7%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, mentre 2 partecipanti su 14 hanno ottenuto una accuratezza del 71.43%.

Per l'isolato EC3\_4, 11 partecipanti su 14 (78.6%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 14 hanno ottenuto una accuratezza  $>80\%$ , mentre 1 partecipante ha ottenuto una accuratezza del 71.43%.

Per l'isolato EC3\_5, 13 partecipanti su 14 (92.8%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, mentre 1 partecipante ha ottenuto una accuratezza del 57.14%.

**Tabella 1. Accuratezza (%) per isolato Confronto Interlaboratorio, Escherichia coli, 2014**

	<b>EC3_1</b>	<b>EC3_2</b>	<b>EC3_3</b>	<b>EC3_4</b>	<b>EC3_5</b>
Totale Risultati	93	93	93	93	93
Risultati corretti	84	90	89	89	90
Accuratezza (%) per Isolato	90,32	96,77	95,70	95,70	96,77

### **3.2 Errori (%) per partecipante**

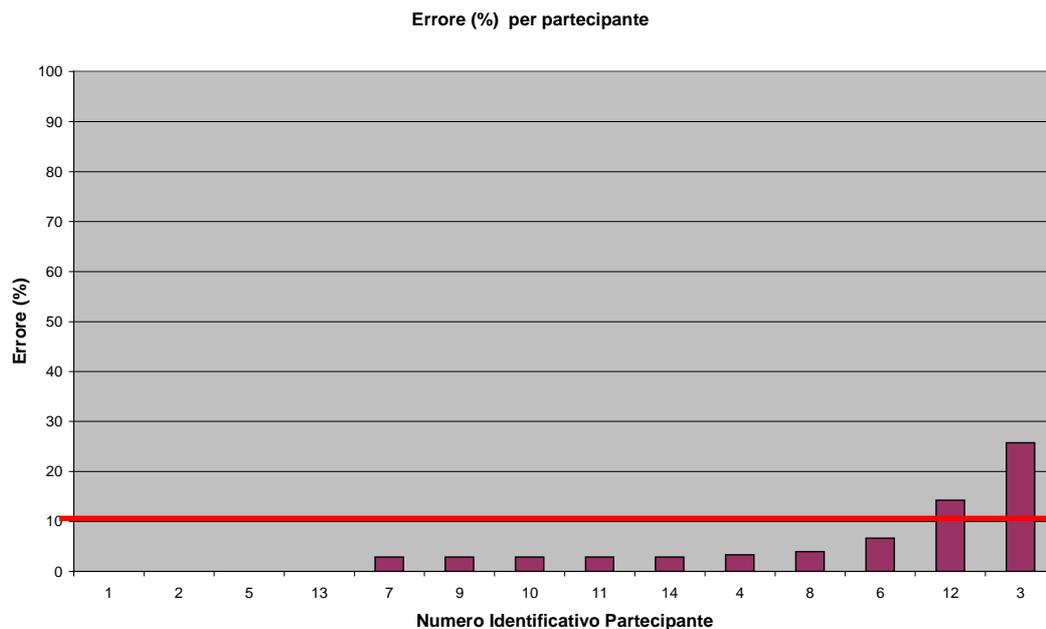
I risultati ottenuti sono mostrati nel Grafico 1 e vengono di seguito riportati nel dettaglio:

-4 partecipanti su 14 (28.6%) hanno ottenuto una % di Errori pari allo 0.0%, partecipante N° 1, 2, 5,13;

-8 partecipanti su 14 (57.1%) hanno ottenuto una % di Errori compresa tra il 2.86% ed il 6.67% partecipanti N° 7, 9, 10, 11, 14, 4, 8, 6;

-2 partecipanti su 14 (14.3% ), hanno ottenuto una % di Errori rispettivamente del 14.29% e del 25.71 N° 12, 3.

#### **Grafico 1. Errore (%) per partecipante, Confronto Interlaboratorio, Escherichia coli, 2014**



### **3.3 Risultati per Struttura partecipante**

Il livello di accuratezza (%) dei 14 partecipanti è riportato in tabella 2, in particolare:

- 4 partecipanti su 14 (28.6%) hanno raggiunto un livello di accuratezza (%) del 100%.
- 7 partecipanti su 14 (50%) hanno raggiunto un livello di accuratezza (%)  $\geq 95\%$ .
- 1 partecipante su 14 (7.1%) ha raggiunto un livello di accuratezza (%)  $\geq 90\%$ .
- 2 partecipanti su 14 (14.3%) hanno ottenuto un livello di accuratezza (%) del 74.29% e del 85.71% rispettivamente.

**Tabella 2. Risultati per Struttura partecipante, Confronto Interlaboratorio, Escherichia coli, 2014.**

Numero Identificativo Partecipante	Errore (%) per Partecipante	Esiti Totali	Esiti Concordi	Accuratezza (%) per Partecipante
1	0,00	35	35	100,00
2	0,00	30	30	100,00
3	25,71	35	26	74,29
4	3,33	30	29	96,67
5	0,00	35	35	100,00
6	6,67	30	28	93,33
7	2,86	35	34	97,14
8	4,00	25	24	96,00
9	2,86	35	34	97,14
10	2,86	35	34	97,14
11	2,86	35	34	97,14
12	14,29	35	30	85,71
13	0,00	35	35	100,00
14	2,86	35	34	97,14



## DISCUSSIONE

Un'analisi generale dei risultati evidenzia che il livello percentuale di Errori ottenuto per *E. coli* è molto basso, infatti 12 partecipanti su 14 (86%) hanno un livello di accuratezza (%) considerato accettabile (accuratezza %  $\geq$  90%).

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

Le più basse percentuali di accuratezza per antibiotico sono state ottenute per molecole quali Ampicillina e Enrofloxacin. In alcuni casi sono stati riportati valori dei diametri di inibizione (es. 0 mm o 6 mm), e quindi interpretati 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 EC3\_1 (90.43%) come riportato in Tabella 1. "Accuratezza % per isolato di *Escherichia coli*", che aveva un risultato Intermedio per Enrofloxacin.

## CONCLUSIONI

In conclusione, il test Interlaboratorio 2014 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.

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.

La misclassificazione dello status reale di un isolato nei confronti di un fluorochinolone rappresentativo per la classe (enrofloxacin), registrato per la terapia degli animali zootecnici e da compagnia, nonché Critical Important Antimicrobial (WHO, 2008), merita ulteriore attenzione da parte del network.

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 (es. CLSI) sia per quanto riguarda i metodi che i criteri interpretativi. Il supporto del CRN- resta comunque disponibile per specifiche problematiche.

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