



RELAZIONE FINALE TEST INTERLABORATORIO PER LA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI 2016 PER GLI ISOLATI DI *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS SPP* .

1. INTRODUZIONE.....	1
2. FASI CHE COMPONGONO IL TEST INTERLABORATORIO	
2.1 Partecipanti.....	2
2.2 Registrazione dei partecipanti.	3
2.3 Invio degli Isolati da parte del CRN-AR.....	3
2.4 Esecuzione del Test.	3
2.5 Invio dei risultati.	4
3. RISULTATI.....	5
3.1 Criteri per la valutazione dei dati	5
3.2 Risultati per <i>Escherichia coli</i> per Struttura partecipante.....	6
3.3 Risultati per <i>Staphylococcus spp</i> per Struttura partecipante.....	7
4. DISCUSSIONE.....	8
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 2016 un Test Interlaboratorio per i Saggi di Sensibilità agli Antibiotici su isolati di *Escherichia coli* e *Staphylococcus 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 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 isolati dagli animali, inclusi alcuni agenti zoonosici.



2. FASI CHE COMPONGONO IL TEST INTERLABORATORIO

2.1 Partecipanti

Nel corso del 2016 è stata inviata una comunicazione alle Direzioni di tutti gli IIZZSS 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 18, di cui in elenco:

IZS Venezie:

- Laboratorio di Diagnostica, sede di Legnaro, Viale dell'Università n 10 - 35020 Legnaro (PD) Responsabile Michela Corrà
- Laboratorio di Udine, Via della Roggia n100, 33030 Basaldella di Campofornido(UD) Responsabile Cocchi
- Laboratorio di Bolzano, Via Laura Conti n 4 – 39100 Bolzano (BZ) Responsabile Alex Tavella

IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

- Sede di Torino, Via Bologna n 148 – 10154 Torino (TO) Responsabile Alessandro Dondo
- Sede di Quart, Aosta Regione Amerique, 7G – 11020 Quart (AO) Responsabile Riccardo Orusa
- Sede di Savona, Via Martini n 6 – 17100 Savona (SV) Responsabile Monica delle Piane

IZS Lombardia ed Emilia Romagna

- Sede di Brescia, Via A. Bianchi n 9 – 25124 Brescia (BS) Responsabile Giovanni Alborali
- Sezione di Bologna, Via Pietro Fiorini n 5 – 40127 Bologna(BO) Responsabile Giuseppe Merialdi

IZS Umbria e Marche

- Sede di Perugia, Via G. Salvemini n 1 – 06126 Perugia (PG) Responsabile Paola Papa
- Sede di Pesaro, Via Canonici n 140 – 61100 Villa Fastiggi (PU) Responsabile Piermario Mangili

IZS Lazio e Toscana

- Sede di Firenze, Via di Castelpulci n 43 – 50010 Scandicci (FI) Responsabile Franco Corrias
- Sede di Latina, Str.da congiunte destre SNC - 04100 Latina (LT) Responsabile Giampaolo Bruni

IZS Abruzzo e Molise

- Sede di Teramo, Via Campo Boario – 64100 Teramo (TE) Responsabile Pietro Badagliacca
- Sede di Campobasso, Via Garibaldi n 155 – 86100 Campobasso (CB) Responsabile Lucio Marino

IZS Puglia e Basilicata

- Sede di Foggia, Via Manfredonia n 20 – 71121 Foggia (FG) Responsabile Pasquale Troiano
- Sede di Matera, Via della Tecnica n 23 – 75100 Matera (MT) Responsabile Gianfranco Santagada

IZS Sardegna:

Sede di Sassari, Via Duca Degli Abruzzi n 8 – 07100 Sassari (SS) Responsabile Stefano Lollai

IZS Sicilia:

Laboratorio Vaccini e Farmacovigilanza, Via G. Marinuzzi, 3 90129 -Palermo (IT) Responsabile Maria Chiara Emanuele



2.2 Registrazione dei partecipanti.

Dal 03 ottobre era possibile iscriversi al seguente link
<http://195.45.99.69/CircuitiInterlaboratorioCRAB/>

2.3 Invio degli Isolati da parte del Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRN-AR) e National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (NRL-AR).

Nel periodo tra il 17 e il 20 ottobre i partecipanti hanno ricevuto gli isolati per l'esecuzione del Test Interlaboratorio: 5 isolati di *Escherichia coli* e 5 di *Staphylococcus* spp.

Gli isolati sono stati inviati in tampone con terreno di trasporto a temperatura ambiente secondo norme UN3373, con l'indicazione di essere coltivati nel più breve tempo possibile. Le colture ottenute dovevano poi essere raccolte e conservate a temperatura di -80°C (o comunque, ad almeno -20°C) fino all'esecuzione dei test.

2.4 Esecuzione del Test.

I test potevano essere eseguiti nel periodo tra il ricevimento degli isolati e il 30 dicembre.

Lo scopo del Test Interlaboratorio per l'antibioticoresistenza è stato quello di dare un supporto ai laboratori diagnostici nell'ambito di una delle prove svolte routinariamente nel laboratorio stesso, si è ritenuto pertanto necessario che i partecipanti eseguissero il test con la metodica e il materiale che normalmente viene impiegato per gli isolati "veri".

Escherichia coli

Sono stati inviati 5 isolati di *Escherichia coli* identificati con una sigla da EC_01_16 a EC_05_16. Gli isolati dovevano essere saggiati con le molecole di seguito elencate, secondo la procedura in uso presso il Laboratorio. I risultati ottenuti dovevano essere categorizzati secondo Standard CLSI VET01-02.

Molecole con le quali eseguire i test di sensibilità:

Ampicillina; Ceftiofur/Cefotaxime; Enrofloxacin; Gentamicina; Sulfisoxazolo; Trimethoprim+Sulfametoxazolo; Tetraciclina; Cloramfenicolo.

Qualora il laboratorio lo preveda gli isolati potevano essere saggiati per il Test di Conferma fenotipica per ESBL, il risultato ottenuto poteva essere inviato con gli altri risultati.

Questo test era da considerarsi non obbligatorio, ma fortemente raccomandato.

Staphylococcus spp.

Sono stati inviati 5 isolati *Staphylococcus* spp. nominati da ST_01_16 a ST_05_16.

Gli isolati dovevano essere saggiati con le molecole di seguito elencate, secondo la procedura in uso presso il Laboratorio. I risultati ottenuti dovevano essere categorizzati secondo Standard CLSI VET01-02.

Molecole con le quali eseguire i test di sensibilità:

Ceftiofur/Cefotaxime; Amoxicillina+Ac.Clavulanico; Ampicillina; Cloramfenicolo; Clindamicina; Enrofloxacin; Eritromicina; Gentamicina; Oxacillina; Sulfisoxazolo; Trimethoprim+Sulfametoxazolo; Tetraciclina.

Qualora il laboratorio lo prevedeva gli isolati potevano essere saggiati per il Test di Conferma per Meticillino-resistenza, il risultato ottenuto poteva essere inviato con gli altri risultati.

Questo test era da considerarsi non obbligatorio, ma fortemente raccomandato.



**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

2.5 Invio dei risultati da parte del CRN-AR

L'invio dei risultati doveva essere effettuato entro e non oltre il 30 dicembre attraverso l'applicativo web. Qualora una o più molecole indicate non fosse stata testata, si doveva riempire il campo relativo al valore numerico con "999" e l'interpretazione con "sensibile".

Per problemi di gestione dell'applicativo la data di invio è stata successivamente spostata al 20 gennaio.



3. RISULTATI

3.1 Criteri per la valutazione dei dati

Per la produzione del Report sull'analisi dei dati ad ogni partecipante è stato attribuito un numero identificativo univoco che consente di mantenere 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.

Accettabilità.

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

I risultati elaborati vengono mostrati come di seguito elencato:



3.2 Risultati per *Escherichia coli* per Struttura partecipante

Per quanto riguarda il livello di accuratezza ottenuto dai partecipanti per gli isolati di *E. coli*, 4 partecipanti hanno ottenuto il 95% dei risultati concordi al risultato atteso, 10 partecipanti hanno ottenuto un livello di accuratezza superiore o uguale all'90%, un partecipante ha ottenuto una percentuale di accuratezza maggiore all'84% e infine un partecipante ha mis-classificato gli isolati.

Di seguito si riportano i valori in dettaglio:

Il Laboratorio partecipante con codice 1 ha ottenuto 33 risultati concordi su 39, con un livello di accuratezza del 84,62%;

Il Laboratorio partecipante con codice 2 ha ottenuto 36 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 90%;

Il Laboratorio partecipante con codice 3 ha ottenuto 38 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 95%.

Il Laboratorio partecipante con codice 4 ha ottenuto 37 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 92,50%

Il Laboratorio partecipante con codice 5 ha ottenuto 37 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 92,50%

Il Laboratorio partecipante con codice 6 ha ottenuto 36 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 90%

Il Laboratorio partecipante con codice 7 ha ottenuto 32 risultati concordi su 35, con un livello di accuratezza del 91,43%

Il Laboratorio partecipante con codice 8 ha mis-classificato quattro isolati su cinque, l'isolato inserito correttamente ha ottenuto 8 risultati concordi su 9.

Il Laboratorio partecipante con codice 9 ha ottenuto 41 risultati concordi su 45, con un livello di accuratezza del 91.1%

Il Laboratorio partecipante con codice 10 ha ottenuto 37 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 92,50%

Il Laboratorio partecipante con codice 11 ha ottenuto 36 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 90%

Il Laboratorio partecipante con codice 12 ha ottenuto 38 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 95%

Il Laboratorio partecipante con codice 13 ha ottenuto 38 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 95%



Il Laboratorio partecipante con codice 14 ha ottenuto 38 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 95%

Il Laboratorio partecipante con codice 15 ha ottenuto 33 risultati concordi su 35, con un livello di accuratezza del 94.3%

Il Laboratorio partecipante con codice 16 ha ottenuto 36 risultati concordi su 40, con un livello di accuratezza del 90%

3.3 Risultati per *Staphylococcus spp* per Struttura partecipante

Per quanto riguarda il livello di accuratezza per *Staphylococcus spp*, 10 partecipanti su 16 hanno ottenuto una accuratezza attesa superiore al 90%. Sei partecipanti hanno ottenuto una % di accuratezza maggiore o uguale al 85%.

Di seguito si riportano i valori in dettaglio:

Il Laboratorio partecipante con codice 1 ha ottenuto 51 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 85%;

Il Laboratorio partecipante con codice 2 ha ottenuto 53 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 88.3%;

Il Laboratorio partecipante con codice 3 ha ottenuto 55 risultati concordi su 58, con un livello di accuratezza del 94,83%;

Il Laboratorio partecipante con codice 4 ha ottenuto 52 risultati concordi su 55, con un livello di accuratezza del 94,5%;

Il Laboratorio partecipante con codice 5 ha ottenuto 56 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 93,3%;

Il Laboratorio partecipante con codice 6 ha ottenuto 55 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 91,6%;

Il Laboratorio partecipante con codice 7 ha ottenuto 51 risultati concordi su 55, con un livello di accuratezza del 92,7%;

Il Laboratorio partecipante con codice 8 ha ottenuto 55 risultati concordi su 61, con un livello di accuratezza del 90,2%;

Il Laboratorio partecipante con codice 9 ha ottenuto 63 risultati concordi su 70, con un livello di accuratezza del 90%;

Il Laboratorio partecipante con codice 10 ha ottenuto 56 risultati concordi su 65, con un livello di accuratezza del 86,1%;

Il Laboratorio partecipante con codice 11 ha ottenuto 48 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 80%;



Il Laboratorio partecipante con codice 12 ha ottenuto 54 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 90%;

Il Laboratorio partecipante con codice 13 ha ottenuto 58 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 96,6%;

Il Laboratorio partecipante con codice 14 ha ottenuto 53 risultati concordi su 60, con un livello di accuratezza del 88,3%;

Il Laboratorio partecipante con codice 15 ha ottenuto 51 risultati concordi su 59, con un livello di accuratezza del 86,4%;

Il Laboratorio partecipante con codice 16 ha ottenuto 47 risultati concordi su 50, con un livello di accuratezza del 94,0%;

DISCUSSIONE

Dei 18 partecipanti indicati, 14 hanno inviato i dati correttamente, due non hanno inviato mai i dati, 2 partecipanti li hanno inviati oltre tempo massimo e utilizzando un formato .xls invece del formato web-oriented.

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

Dei 14 partecipanti che hanno inviato i dati attraverso il sistema web-oriented, un partecipante ha misclassificato quattro dei cinque isolati di *Escherichia coli*.

Molti dei partecipanti non hanno inviato i risultati per tutte le molecole richieste e alcuni partecipanti hanno inviato molecole diverse per i diversi isolati della stessa specie batterica.

Alcuni partecipanti hanno riportato risultati non concordanti con il valore vero della categorizzazione SIR, poiché probabilmente hanno utilizzato criteri di interpretazione non in accordo con lo Standard CLSI.

I partecipanti al circuito che hanno inserito correttamente sul Sistema i dati ottenuti, hanno potuto visualizzare immediatamente, dal sistema stesso, un report che consentiva loro di confrontare i risultati ottenuti con i risultati attesi. Questo strumento informatico permetteva ai partecipanti di ottenere rapidamente un criterio di valutazione oggettivo e personalizzato.

Diversi partecipanti hanno fornito come diametro di inibizione (tecnica Disk Diffusion) valori numerici molto bassi, che comprendevano anche lo zero. Tali valori (incluso il valore zero) sono inaccettabili secondo gli Standard di Riferimento CLSI, in quanto il valore più basso consentito è 6. Il valore di 6 mm corrisponde infatti ad assenza totale di un alone di inibizione intorno al dischetto di antibiotico saggiato, che appunto misura 6mm.



Un partecipante ha fornito i risultati dei mm degli aloni di inibizione comprensivi del valore decimale, la norma prevede però di arrotondare tale decimale all'unità più prossima.

Poiché le modalità di partecipazione a questo circuito e il ritorno degli esiti al CRN-AR sono stati molto difforni, si è ritenuto sufficiente dare i risultati di concordanza per singolo Laboratorio partecipante, rispetto ai valori attesi.

Per quanto riguarda il livello di concordanza ottenuto dai partecipanti per gli isolati di *E. coli*, 14 partecipanti su 16 (87,5%) hanno ottenuto percentuale di accuratezza superiore o uguale all'90%. Inoltre, 4 su 16 (25,0%) hanno ottenuto un'accuratezza uguale al 95%

Per quanto riguarda il livello di concordanza per *Staphylococcus spp*, 10 partecipanti su 16 (62,5%) hanno ottenuto una concordanza superiore al 90%. Un solo laboratorio partecipante su 16 (6,25%) ha ottenuto una concordanza $\geq 95\%$ (96,6%).

Per quanto riguarda i risultati discordanti, nella maggior parte dei 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.

CONCLUSIONI

In conclusione, il test Interlaboratorio 2016 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".

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, qualora il percorso di attuazione di quanto previsto dallo Standard e la conseguente procedura di validazione secondo lo Standard incontrasse problemi di cui il Laboratorio non riesce a trovare soluzione.

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.