



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

RELAZIONE FINALE TEST INTERLABORATORIO PER LA SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI 2018 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..... | 3 |
| 3. RISULTATI | |
| 3.1 Criteri per la valutazione dei risultati..... | 4 |
| 3.2 Analisi dei risultati..... | 5 |
| 3.2.1 Accuratezza (%) per <i>E. coli</i> | 5 |
| 3.2.2 Accuratezza (%) per <i>Staphylococcus spp.</i> | 5 |
| 3.2.3 Errori (%) per partecipante per <i>E. coli</i> | 6 |
| 3.2.4 Errori (%) per partecipante per <i>Staphylococcus spp.</i> | 7 |
| 4. DISCUSSIONE..... | 8 |
| 5. CONCLUSIONI..... | 8 |

1. INTRODUZIONE

Lo scopo di tale Test interlaboratorio è stato quello di monitorare la qualità dei dati prodotti dai laboratori IZZSS 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 per l'Antibioticoresistenza (CRN-AR).

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 riportato 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 (inclusi alcuni agenti zoonosici) ed opportunisti degli animali.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

2. FASI CHE COMPONGONO IL TEST INTERLABORATORIO

2.1 Partecipanti

Le Strutture che hanno aderito sono risultate 18, di cui in elenco:

IZS Venezia:

Laboratorio di Diagnostica - sede di Legnaro Referente Dott.ssa Eliana Schiavon
SCT1 – Verona e Vicenza Responsabile Dott. Barberio

IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

Sede di Torino Responsabile Dott. Alessandro Dondo

IZS Lombardia ed Emilia Romagna

Il referente per l'Antibioticoresistenza Dott. Andrea Luppi ha chiesto, ed ottenuto, di poter sub-coltivare la propria aliquota e inviarla ai laboratori territoriali del IZSLER, così hanno potuto partecipare:

Sezione di Reggio Emilia Responsabile Dott. Paolo Bonilauri

Sezione di Cremona Responsabile Matteo Gradassi

Sezione di Bologna Responsabile Maria Cristina Fontana

Sezione di Piacenza Responsabile Chiara Anna Garbarino

Sezione di Forlì Responsabile Laura Fiorentini

IZS Umbria e Marche

Sede di Pesaro Responsabile Dott. Piermario Mangili. Per la regione Umbria non c'è stata alcuna adesione

IZS Lazio e Toscana

Sede di Firenze Responsabile Dott. Franco Corrias

Sede di Latina Responsabile Dott. Giampaolo Bruni

IZS Abruzzo e Molise

Sede di Teramo Responsabile Dott. Pietro Badagliacca. Per la regione Molise non c'è stata alcuna adesione

IZS Puglia e Basilicata

Sede di Foggia Responsabile Dott. Pasquale Troiano

Sede di Matera Responsabile Dott.ssa Rosa Fraccalvieri

IZS Sardegna:

Sede di Sassari Responsabile Dott. Stefano Lollai

IZS Sicilia:

Laboratorio Vaccini e Farmacovigilanza -Palermo (IT) Responsabile Dott.ssa Maria Chiara Emanuele

IZS Mezzogiorno

UOS Diagnostica Speciale – Ittiopatologia Dipartimento Sanità Animale Portici (NA) Responsabile Dott.ssa Anna Cerrone. Per la regione Calabria non c'è stata alcuna adesione.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

2.2 Registrazione dei partecipanti.

L'iscrizione al Circuito è avvenuta attraverso richiesta diretta via E-mail alla Dott.ssa Alessia Franco

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 25 e il 29 ottobre 2018 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 una 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 compreso tra il ricevimento degli isolati e il giorno 11 gennaio 2019. 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 da "Ecoli18A" a "Ecoli18E". 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.

Molecole con le quali eseguire i test di sensibilità: Ampicillina; ceftiofur/cefotaxime; enrofloxacin; gentamicina; trimethoprim+sulfametox; tetraciclina; cloramfenicolo.

Se previsto dal laboratorio, gli isolati potevano essere saggiati per il Test di Conferma fenotipica per ESBL e il risultato ottenuto poteva poi 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 "Staphy18A" a "Staphy18E".

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.

Molecole con le quali eseguire i test di sensibilità: Penicillina; ceftiofur/cefotaxime; cloramfenicolo; clindamicina; enrofloxacin; eritromicina; gentamicina; oxacillina; cefoxitina; trimethoprim+sulfametox; tetraciclina.

Se previsto dal laboratorio, gli isolati potevano essere saggiati per il Test di Conferma per Meticillino-resistenza e il risultato ottenuto poteva poi essere inviato con gli altri risultati.

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

2.5 Invio dei risultati.

L'invio dei risultati doveva essere effettuato entro e non oltre il giorno 11 gennaio 2019 attraverso il database in formato Excel fornito via mail.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

3. RISULTATI

3.1 Criteri per la valutazione dei risultati

Per la produzione del Report sull'analisi dei dati, è stato attribuito ad ogni partecipante 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 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 isolato

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

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%.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

3.2 Analisi dei risultati

Complessivamente i partecipanti sono stati 17, di cui 14 hanno eseguito il Test di sensibilità agli antibiotici con la metodica di disk diffusion e 3 hanno eseguito il Test di sensibilità agli antibiotici con la metodica della broth dilution per la misurazione della Minima Concentrazione Inibente.

I risultati elaborati vengono mostrati come di seguito elencato:

- 3.2.1 Accuratezza (%) per isolato di *E. coli*
- 3.2.2 Accuratezza (%) per isolato di *Staphylococcus* spp.
- 3.2.3 Errore (%) per partecipante per *E. coli*
- 3.2.4 Errore (%) per partecipante per *Staphylococcus* spp.

3.2.1 Accuratezza (%) per *E. coli*

Per l'isolato Ecoli18A, tutti i partecipanti hanno ottenuto un'accuratezza (%) del 100%.

Per l'isolato Ecoli18B, 12 partecipanti su 17 (70.6%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 17 (11.8%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 85\%$, 3 partecipanti su 17 (17.6%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 83\%$. Gli errori ottenuti sono stati nei confronti dell'ampicillina, 5 partecipanti hanno ottenuto un basso livello di sensibilità, i partecipanti che hanno eseguito i test in broth dilution, pur avendo ottenuto il dato quantitativo corretto (MIC attesa =2, ottenuta =1) hanno interpretato l'isolato come R.

Per l'isolato Ecoli18C, 14 partecipanti su 17 (82.3%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 1 partecipante su 17 (5.8%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 85\%$, 2 partecipanti su 17 (11.8%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 83\%$.

Per l'isolato Ecoli18D, 17 partecipanti su 17 (100%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%.

Per l'isolato Ecoli18E, 9 partecipanti su 17 (52.9%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 5 partecipanti su 17 (29.4%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 85\%$, 2 partecipanti su 17 (41.2%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 83\%$, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto un'accuratezza pari al 71.4%.

3.2.2 Accuratezza (%) per *Staphylococcus*

Per l'isolato Staphy18A, 8 partecipanti su 17 (47,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 7 partecipanti su 17 (41.2%) hanno ottenuto una accuratezza del 90%, 2 partecipanti su 17 (11.8%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$.

Per l'isolato Staphy18B, 8 partecipanti su 17 (47,1%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto una accuratezza del 90%, 7 partecipanti su 17 (41.2%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 80\%$, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto una accuratezza pari a 72.7%.

Per l'isolato Staphy18C, 13 partecipanti su 17 (76.5%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 2 partecipanti su 17 (11.8%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 90\%$, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto una accuratezza pari a 80%, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto una accuratezza pari a 72.7%.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

Per l'isolato *Staphy18D*, 13 partecipanti su 17 (76.5%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 3 partecipanti su 17 (17.6%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 90\%$, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto una accuratezza pari a 81.8%.

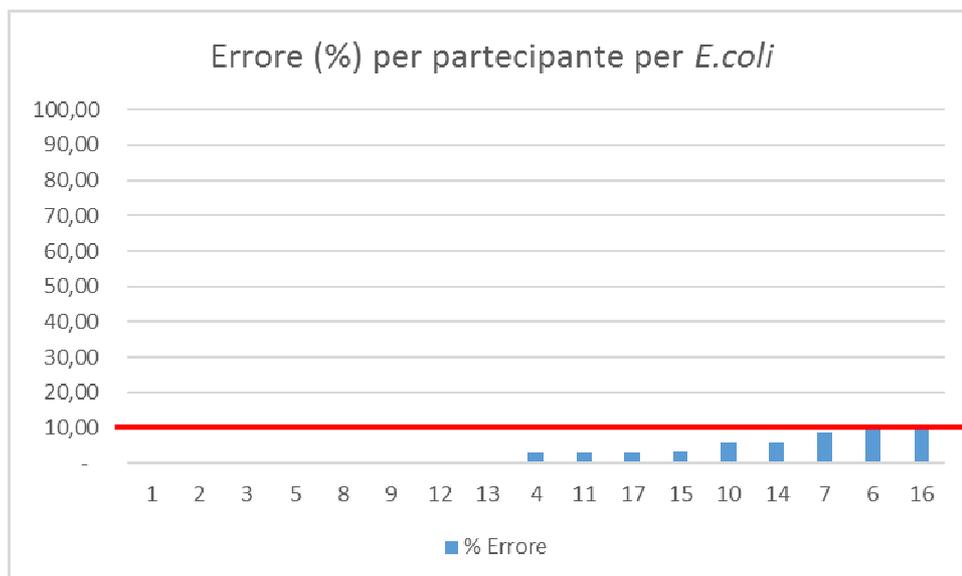
Per l'isolato *Staphy18E*, 3 partecipanti su 17 (17.6%) hanno ottenuto una accuratezza del 100%, 8 partecipanti su 17 (47.1%) hanno ottenuto una accuratezza $\geq 90\%$, 1 partecipante su 17 (5.8%) ha ottenuto una accuratezza pari a 88.9%, 5 partecipanti su 17 (29.4%) ha ottenuto una accuratezza pari a $\geq 70\%$.

Si tratta di un isolato MRSA e la maggior parte dei partecipanti, pur avendo correttamente individuato la resistenza nei confronti dell'oxacillina e/o della cefoxitina (antibiotici che gli standard CLSI individuano per predire la resistenza alla Meticilina), non hanno applicato la regola riportata nel documento CLSI VET08 4th ed. Tabella 2C e al link <http://www.izslt.it/crab/wp-content/uploads/sites/8/2018/11/Linee-Guida-beta-lattamici-prototipo-Staphylococcus-spp.pdf>) che specifica come gli isolati di *Staphylococcus* spp. resistenti alla oxacillina (per *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*) o alla cefoxitina (per *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus lugdunensis*) sono resistenti a tutte le molecole antimicrobiche beta-lattamiche attualmente disponibili eccetto quelle anti-MRSA.

3.2.3 Errori (%) per partecipante per *E. coli*

I risultati ottenuti sono mostrati nel Grafico 1. Tutti i partecipanti hanno ottenuto una percentuale di errore inferiore al 90% che rappresenta la soglia di accettabilità.

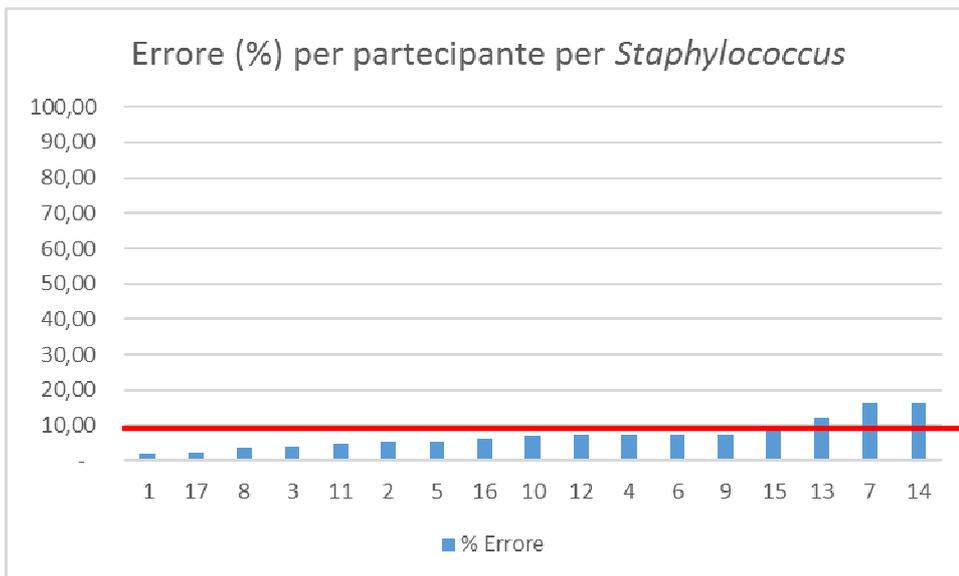
Grafico 1. Errore (%) per partecipante per tutti gli isolati di *Escherichia coli*, 2018.



3.2.4 Errori (%) per partecipante per *Staphylococcus*

I risultati ottenuti sono mostrati nel Grafico 1 mostrano che 14 partecipanti su 17 hanno ottenuto una percentuale di errore inferiore al 10% che rappresenta la soglia di accettabilità, tre partecipanti su 17 hanno ottenuto una percentuale di errore ≥ 10 .

Grafico 1. Errore (%) per partecipante per tutti gli isolati di *Staphylococcus* spp., 2018.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

4. DISCUSSIONE

Un'analisi generale dei risultati evidenzia che il livello percentuale di Errori ottenuto per *E. coli* è molto basso, infatti 17 partecipanti su 17 (100%) 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.

Il livello percentuale di Errori ottenuto per *Staphylococcus* è in generale molto basso, infatti 14 partecipanti su 17 (82.3%) hanno un livello di accuratezza (%) considerato accettabile (accuratezza (%) $\geq 90\%$), mentre tre partecipanti su 17 hanno ottenuto un livello di accuratezza inferiore all'80%. Il passo successivo sarà quello di confrontarci con i singoli partecipanti per ottenere un miglioramento delle performance.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, il test Interlaboratorio 2018 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 sia nei confronti dei beta-lattamici rappresentativi per la classe, in qualità di 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-AR resta comunque disponibile per le varie problematiche emerse.

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