



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 2020 PER GLI ISOLATI DI *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS SPP.* ORGANIZZATO DAL CRN-AR, NRL-AR NEL 2020

1. INTRODUZIONE.....	1
2. ESECUZIONE TEST INTERLABORATORIO	
2.1 Partecipanti.....	2
2.2 Registrazione dei partecipanti	3
2.3 Invio degli Isolati da parte del CRN-AR, NRL-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 Concordanza (%) per <i>E. coli</i>	5
3.2.2 Concordanza (%) per <i>Staphylococcus spp</i>	6
3.2.3 Discordanti (%) per partecipante per <i>E. coli</i>	7
3.2.4 Discordanti (%) per partecipante per <i>Staphylococcus spp</i>	8
4. DISCUSSIONE.....	9
5. CONCLUSIONI	9

1. INTRODUZIONE

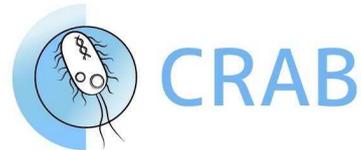
Lo scopo di tale test interlaboratorio è stato quello di monitorare la qualità dei dati prodotti dai laboratori IZZSS presenti sul territorio per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici e contestualmente di fornire, laddove necessario, un supporto tecnico-scientifico per i laboratori degli IZZSS (diagnostica degli agenti eziologici delle malattie batteriche animali, incluse alcune malattie zoonosiche anche da agenti food-borne). Tali attività si ritengono prioritarie nell'ambito delle funzioni di servizio come Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza (CRN-AR) e del National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (NRL-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, e nella sorveglianza/monitoraggio degli agenti patogeni o commensali opportunisti zoonosici, specialmente quelli che possono essere trasmessi con gli alimenti.

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. ESECUZIONE TEST INTERLABORATORIO

2.1 Partecipanti

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

IZS Venezie:

- **SCT3 -Padova e Adria** -Responsabile Antonio Barberio
- **SCT4 -Friuli Venezia Giulia** -Responsabile Fabrizio Agnoletti
- **SCT6 -Bolzano** -Responsabile dott. Alex Tavella
- **SCT5 -Trento** -Responsabile Dott. Debora Dellamaria
- **SCT2 -Treviso, Belluno e San Donà di Piave** -Responsabile Dott. Luca Bano

IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

- **Sede di Torino** -Responsabile Simona Zoppi
- **Sede di Quart** -Aosta Responsabile Riccardo Orusa
- **Sede di Savona** -Responsabile Monica delle Piane

IZS Lombardia ed Emilia Romagna

- **Sede di Brescia** -Responsabile Giovanni Alborali
- **Sezione di Parma** -Responsabile Andrea Luppi

IZS Umbria e Marche

- **Sede di Perugia** -Responsabile Paola Papa
- **Sede di Pesaro** -Responsabile Dott. Piermario Mangili.

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 è stata comunicata alcuna adesione

IZS Puglia e Basilicata

- **Sede di Foggia** -Responsabile Dott. Pasquale Troiano
- **Sede di Matera** -Responsabile Dott.ssa Rosa Fraccalvieri

IZS Mezzogiorno

- **Dipartimento Sanità Animale Portici (NA)** -Responsabile Dott.ssa Anna Cerrone.
- **Sezione di Catanzaro** -Responsabile Francesco Casalnuovo.

IZS Sardegna:

Per la regione Sardegna non è stata comunicata alcuna adesione

IZS Sicilia:

Per la regione Sicilia non è stata comunicata 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).

Nella prima settimana di ottobre 2020 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 l'ultima settimana di febbraio 2020. 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 di routine nel laboratorio stesso. Si è ritenuto pertanto che i partecipanti eseguissero il test con la metodica e il materiale routinariamente impiegati per gli isolati "veri".

Escherichia coli

Sono stati inviati 5 isolati di *Escherichia coli* identificati da "Ecoli20A" a "Ecoli20E". 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.* identificati da "Staphy20A" a "Staphy20E". 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 è stato effettuato entro l'ultima settimana di febbraio 2020 attraverso l'apposito applicativo web all'indirizzo <https://www.izslt.it/crab/circuiti-interlaboratorio/>. Ai partecipanti al circuito sono stati forniti il manuale d'uso e le credenziali di accesso personali.



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 sulla base del risultato numerico ottenuto e confrontati con il Valore Atteso (Valore di Riferimento).

Definizioni

Concordanza: un risultato qualitativo si considera concorde quando è lo stesso del Valore Atteso.

Concordanza (%): è il rapporto (%) tra il totale degli esiti concordi con il Valore Atteso e il totale degli esiti ottenuti.

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

Concordanza (%) per isolato

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

Concordanza (%) per partecipante per agente

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

E' bene ricordare che la discordanza tra il risultato ottenuto e il Valore Atteso può generare tipologie di errore di peso differente:

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.

In ogni caso per gli scopi di interpretazione dei dati ottenuti in questo circuito, e per semplificare la lettura del Report, tale tipologia di Errori verrà analizzata in modo cumulativo, in termini di **Discordanti %** (Frazione o percentuale complementare di concordanza %).

Discordanti (%) per isolato

Il rapporto espresso in % tra la somma dei Discordanti (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.

Discordanti (%) per partecipante

Il rapporto espresso in % tra la somma dei Discordanti (risultati discordanti rispetto al valore di riferimento) e la somma dei risultati ottenuti per tutti gli antibiotici per tutti gli isolati, per singolo agente e per singolo laboratorio partecipante.

Accettabilità.

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

Di conseguenza si ritiene accettabile una % di Discordanti non superiore al 10%, nonostante una performance di buon livello può essere considerata quella con valori percentuali di discordanza di $\leq 5\%$.



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 19, di questi 6 hanno eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con la metodica della broth microdilution (microdiluizione in brodo) per la misurazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) e 13 partecipanti hanno eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con la metodica di disk diffusion (DD) per la categorizzazione dei risultati dei diametri di inibizione come S, I, R. Dei 19 partecipanti 13 si sono avvalsi delle metodiche di conferma molecolare per le resistenze ai Beta-lattamici a spettro esteso (*Escherichia coli* ESBL/AmpC produttori) e/o ricerca del gene *mec* (A-C) per *Staphylococcus* spp.

Per la produzione del Report di analisi dei risultati ottenuti è stato attribuito un numero progressivo nel modo seguente:

- ad ogni partecipante che ha eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con la metodica della broth microdilution per la misurazione della Minima Concentrazione Inibente un numero progressivo da 1 a 6 accompagnato dalla sigla MIC.
- ad ogni partecipante che ha eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con la metodica di disk diffusion un numero progressivo da 7 a 19 accompagnato dalla sigla DD.

Ogni partecipante ha potuto verificare la concordanza dei propri risultati con i valori attesi accedendo all'applicativo web utilizzato per l'invio dei risultati.

Il portale per la restituzione dei risultati permetteva inoltre, anche la registrazione dei risultati degli isolati ATCC che, secondo Documenti di riferimento, dovrebbero essere eseguiti nella stessa seduta di analisi. Tuttavia pochi partecipanti hanno inviato i dati relativi ai risultati ottenuti sugli isolati ATCC di riferimento per la relativa seduta di analisi.

I risultati elaborati vengono mostrati come di seguito elencato:

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

3.2.1 Concordanza (%) per *E. coli*

L'isolato Ecoli20A è sensibile a tutte le molecole indicate nel panel da testare.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 5 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, un solo partecipante ha ottenuto una concordanza del 28% circa.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 4 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 9 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

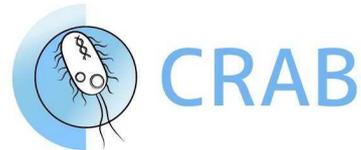
L'isolato Ecoli20B è resistente a tutti i Beta-lattamici per una mutazione puntiforme cromosomica.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 2 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, 4 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 3 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 10 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.



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



Centro di Referenza Nazionale
per l'Antibioticoresistenza

L'isolato Ecoli20C è sensibile ai Beta-lattamici a Spettro Esteso.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 4 su 6 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 2 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 12 su 13 hanno ottenuto una concordanza del 100%, un solo partecipante ha ottenuto una concordanza $< 90\%$.

L'isolato Ecoli20D è produttore di ESBL.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 2 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, 4 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD 7 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 6 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

L'isolato Ecoli20E, è produttore di ESBL.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 5 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, un solo partecipante ha ottenuto una concordanza $< 50\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 13 su 13 hanno ottenuto una concordanza del 100%.

3.2.2 Concordanza (%) per *Staphylococcus*

L'isolato Staphy20A è MRSA.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 5 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, un solo partecipante ha ottenuto una concordanza $< 90\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 7 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 6 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

L'isolato Staphy20B è MRSA.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 6 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 9 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 4 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

L'isolato Staphy20C è sensibile a tutte le molecole proposte.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 6 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 11 su 13 hanno ottenuto una concordanza del 100%, 2 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

L'isolato Staphy20D è MSSA.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 4 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, 2 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 9 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 2 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$, un partecipante non ha inviato alcun risultato per questo isolato.

L'isolato Staphy20E è MRSA.

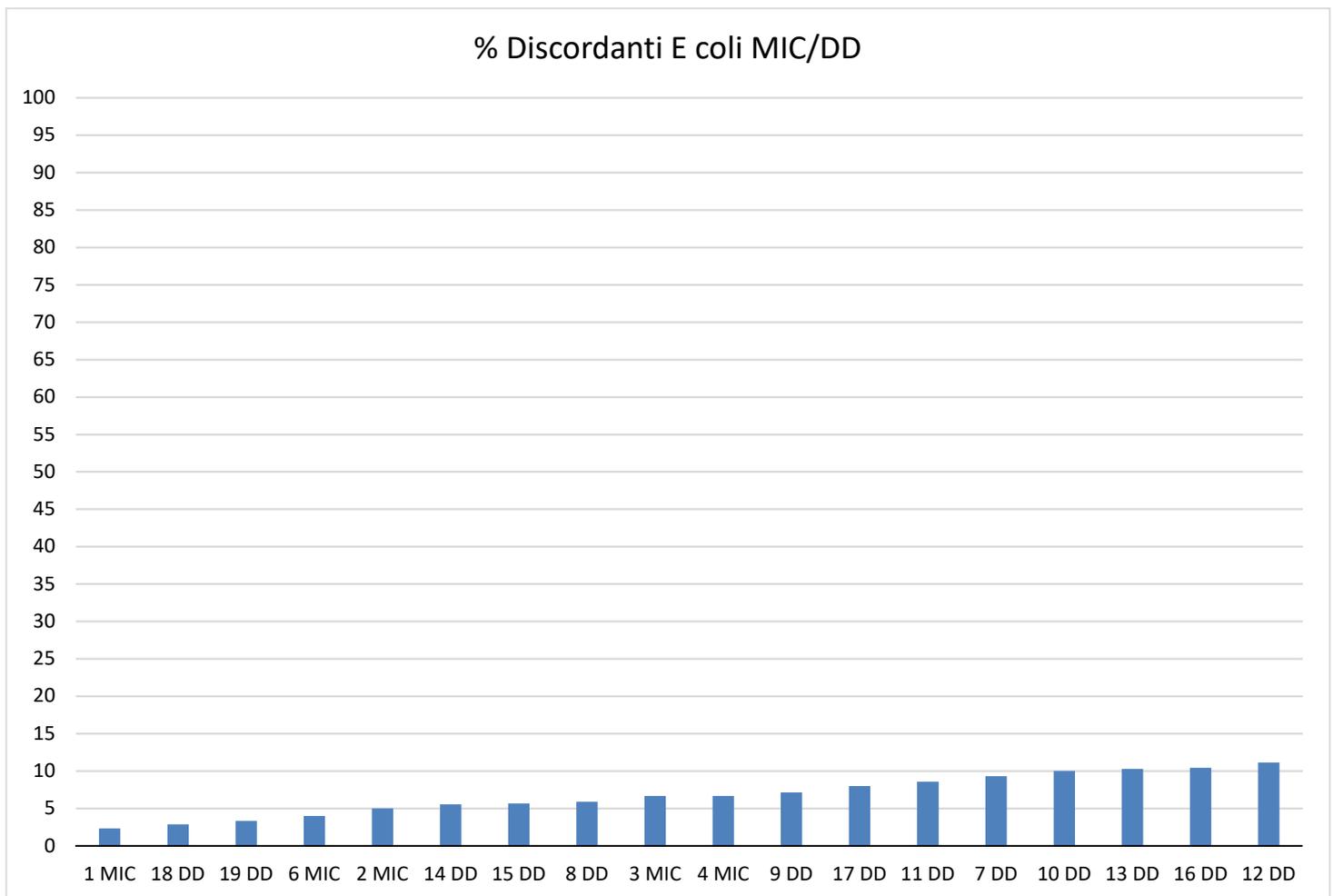
Dei partecipanti che hanno eseguito il test in MIC, 2 su 6 hanno ottenuto una concordanza del 100%, 4 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

Dei partecipanti che hanno eseguito il test in DD, 9 su 13 hanno ottenuto una concordanza $\geq 90\%$, 4 partecipanti hanno ottenuto una concordanza $< 90\%$.

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

I risultati ottenuti sono mostrati nel Grafico 1. Tutti i partecipanti tranne 2 hanno ottenuto una percentuale di discordanti inferiore al 10% che rappresenta la soglia di accettabilità.

Grafico 1. Discordanti (%) per partecipante per tutti gli isolati di *Escherichia coli*, 2020.

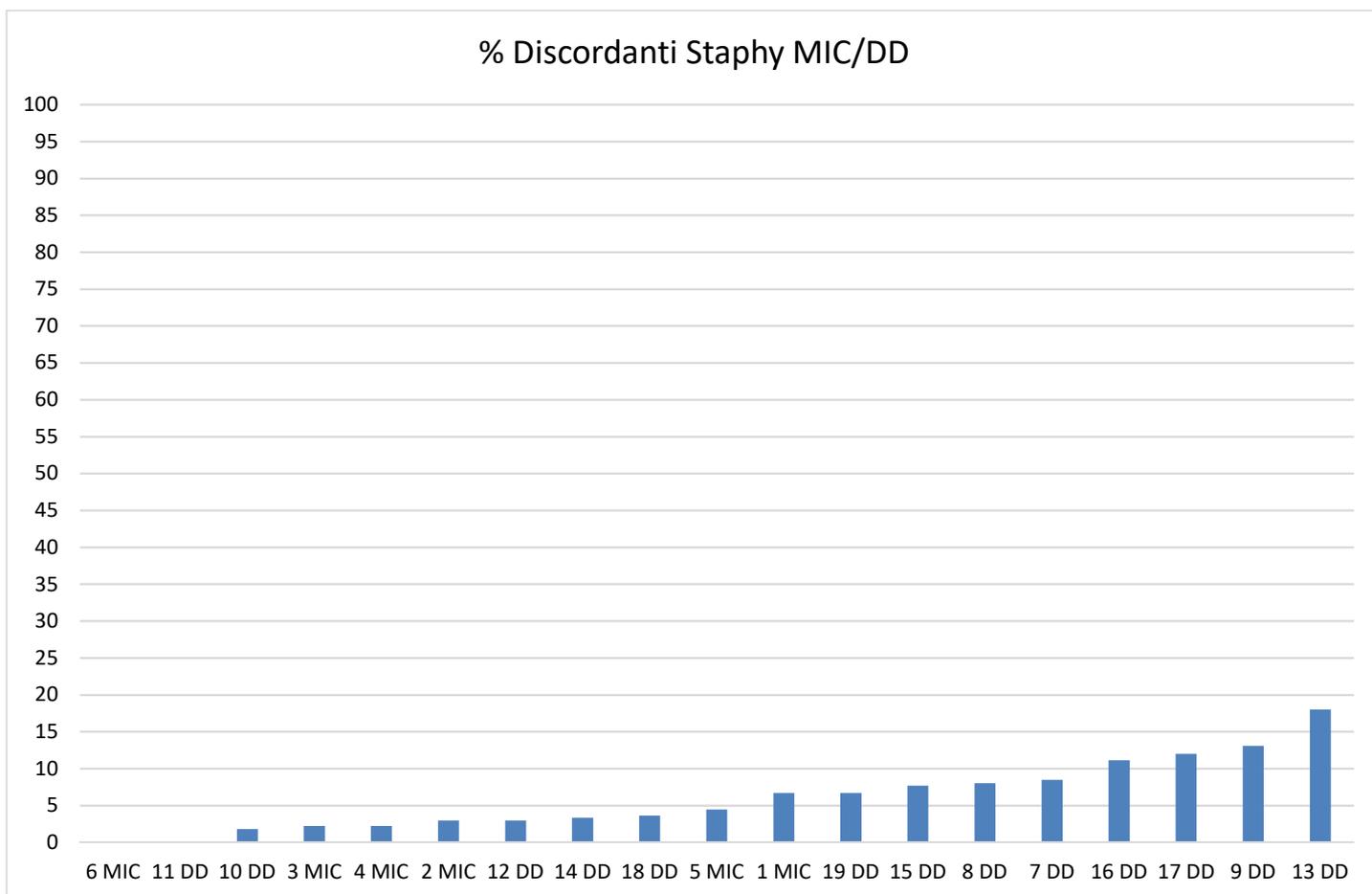


3.2.4 Discordanti (%) per partecipante per *Staphylococcus*

I risultati ottenuti sono mostrati nel Grafico 1 e mostrano che 15 partecipanti su 19 hanno ottenuto una percentuale di discordanti inferiore al 10% che rappresenta la soglia di accettabilità.

Infine, 4 partecipanti su 19 hanno ottenuto una percentuale di discordanti $\geq 10\%$.

Grafico 1. Discordanti (%) per partecipante per tutti gli isolati di *Staphylococcus* spp., 2020.





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 risultati discordanti ottenuto per *E. coli* e per *Staphylococcus* non è elevato, infatti tutti i partecipanti hanno ottenuto una percentuale di discordanti inferiore al 10% (che rappresenta la soglia di accettabilità) per almeno una delle due specie batteriche testate. Dei 19 partecipanti, 13 si sono avvalsi delle metodiche di conferma molecolare per le resistenze ai Beta-lattamici per almeno una delle specie batteriche testate.

Dall'analisi dei dati, i risultati discordanti ottenuti da ciascun partecipante, non sono riconducibili a specifiche combinazioni isolato-antibiotico, **e poiché i partecipanti non hanno inviato i dati dei Controlli di Qualità**, non è stato possibile eseguire una valutazione della validità del test.

Il passo successivo sarà, laddove richiesto, quello di confrontarci in qualità di CRN-AR e NRL-AR, con i singoli partecipanti per valutare eventuali punti critici rilevabili dai singoli laboratori (per confronto diretto tra risultato ottenuto e risultato atteso), che dovranno essere affrontati per ottenere un miglioramento delle performance.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, il test Interlaboratorio 2020 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 esiti discordanti 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 di cefalosporine a spettro esteso (es. vs molecole prototipo di cefalosporine di 3a generazione) che di fluorochinoloni testati come rappresentativi della classe, in qualità di Highest Priority Critical Important Antimicrobial (WHO, 2016), merita ulteriore attenzione da parte del network.

Il livello di concordanza 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 (raccomandato Standard CLSI VET nel settore della diagnostica animale) sia per quanto riguarda i metodi che i criteri interpretativi. Il supporto del CRN-AR e NRL-AR resta comunque disponibile per le varie problematiche emerse ed individuate dai laboratori del network.

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