

Febbraio 2010

Risultati Circuito MD 1-10

Schema microbiologia diagnostica

1. Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, ricerca *Taylorella equigenitalis*, organizzato dal Laboratorio di Padova – Struttura Complessa Territoriale 3, dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie è nato dall'esigenza concreta del laboratorio di batteriologia diagnostica di disporre di uno strumento oggettivo per permettere il confronto di metodiche analitiche e lo scambio di informazioni tecnico-scientifiche tra laboratori. I circuiti interlaboratorio rappresentano, infatti, importanti momenti di confronto per poter valutare la corretta esecuzione delle procedure di prova e per evidenziare problematiche operative nei confronti delle quali mettere in atto azioni correttive, inoltre, in linea con quanto richiesto dai criteri di miglioramento continuo previsti dal Sistema Qualità, si rivelano essere indispensabili strumenti per garantire l'assicurazione qualità dei risultati e per valutare le performance di laboratorio, inclusi quelli che svolgono attività di tipo diagnostico.

Partecipano al circuito sia laboratori territoriali dell'IZSve sia laboratori di altri Istituti. I primi per l'esecuzione della prova applicano la procedura accreditata PDP DIA 03, redatta secondo le linee guida indicate nel Manuale OIE; i laboratori esterni sono liberi di applicare le rispettive procedure per l'analisi dei campioni.

La preparazione dei campioni prova prevede l'utilizzo di ceppi batterici di riferimento (ATCC, NCTC) e ceppi batterici isolati e identificati nel corso dell'attività diagnostica.

Il circuito comprende due distribuzioni/anno costituite da 6 campioni prova liofilizzati prodotti con le seguenti caratteristiche: colture pure di *Taylorella equigenitalis*; colture miste di uno o due ceppi batterici associati o meno a *T. equigenitalis* e campioni prova sterili.

Per ogni lotto di campioni prova prodotto, sono eseguite prove di omogeneità e di stabilità. Tali prove sono ripetute su tutti i lotti scelti per il circuito, al momento dell'invio e dopo dieci giorni, a garanzia della stabilità dei liofilizzati fino al momento di utilizzo da parte dei laboratori partecipanti.

I campioni prova, opportunamente identificati, sono inviati a temperatura controllata ($+4^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$), mediante corriere, rispettando le condizioni previste dalla normativa vigente riguardante il trasporto di materiale biologico. Con i campioni prova viene inviata, inoltre, la seguente documentazione: scheda di sicurezza, istruzioni per la conservazione ed il ripristino del liofilizzato, modulistica da compilare per la registrazione dei risultati.

Ciascun laboratorio coinvolto dovrà contattare il responsabile del circuito in caso di mancata ricezione dei campioni prova o in caso di anomalie riscontrate (rottura dei contenitori, mancanza della documentazione, ecc.).

I risultati dei laboratori partecipanti vengono elaborati statisticamente, utilizzando la statistica Kappa di Cohen (K) che permette di valutare il grado di concordanza tra risultati ottenuti e risultati attesi.

2. Bibliografia

- Douglas C. (2005) "Controllo statistico della qualità". McGraw-Hill Companies
- Grimaldi M., Bordin P., Mioni R., Comin D., Trevisan R., Mancin M., Milan F. (2007) "L'assicurazione della qualità dei risultati tramite l'utilizzo di circuiti interlaboratorio. Esperienze dei laboratori di Microbiologia Alimentare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie". *Biologi Italiani* 4, 68 –73.
- Quinn P.J., Carter M.E. et Al. (1994) "Clinical Veterinary Microbiology". Wolfe Ed., 178-179.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Sidney Siegel, N. John Castellan Jr. (1992) “Statistica non parametrica”. McGraw-Hill Companies
Contagious equine metritis. “Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals”
(2005) OIE, chapter 2.5.1

UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura

3. Composizione dei campioni prova

Circuito MD1-10

N° identificativo	Contenuto
A/10	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184 + <i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939
B/10	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184 + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
C/10	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
D/10	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184 + <i>Candida tropicalis</i> 3636/P07
E/10	Polimicrobismo da tampone genitale equino
F/10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 + <i>klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883

4. Preparazione del campione

- Risospendere il liofilizzato con 2,0 ml di brodo nutriente sterile
- Lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti
- Mescolare accuratamente fino a completa solubilizzazione
- Seminare i terreni culturali utilizzando un'ansa sterile di almeno 10 µl
- Ulteriori indicazioni per la manipolazione dei campioni di prova sono riportate nella scheda di sicurezza del circuito Aqua: Schema Microbiologia Diagnostica

5. Determinazioni e valori assegnati

Determinazione	Valore assegnato
Ricerca di <i>Taylorella equigenitalis</i>	Presente/Assente

6. Interpretazione dei risultati

L'analisi dei campioni prova fornisce una risposta di tipo qualitativo: positivo, nel caso sia evidenziata nel campione prova la presenza di *Taylorella equigenitalis*; negativo, nel caso in cui la sua presenza non sia rilevata.

I dati raccolti dai laboratori partecipanti sono elaborati statisticamente utilizzando la statistica Kappa di Cohen, che fornisce una misura dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte qualitative fornite dai laboratori partecipanti e il laboratorio di riferimento che rappresenta il “gold standard”.

7. Termini ed abbreviazioni

Termini	Abbreviazioni
Concordanza/Riproducibilità	K
Non Pervenuto	np
p-value	Significatività statistica
Presenza/assenza	+/-

Per l'interpretazione dei valori del K di Cohen, si rimanda alla scala di *Landis & Koch* di seguito riportata:

K	Riproducibilità
≤ 0	Scarsissima
0.01-0.20	Scarsa
0.21-0.40	Discreta
0.41-0.60	Moderata
0.61-0.80	Buona
0.81-1.00	Ottima

8. Ruoli e responsabilità

Responsabile circuito interlaboratorio
 Responsabile tecnico
 Responsabile statistico

Dr.ssa Michela Corrò
 Sig.ra Silvia Friso
 Dr.ssa Marzia Mancin

9. Laboratori partecipanti



Figura 1: laboratori partecipanti

10. Risultati

10.1. Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio

DISTRIBUZIONE MD1 – 10						
N° identificativo	A/10	B/10	C/10	D/10	E/10	F/10
Risultato atteso	+	+	-	+	-	-
02/MD	+	+	-	+	-	-
03/MD	+	+	-	+	-	-
04/MD	+	+	-	+	-	-
05/MD	+	+	-	+	-	-
06/MD	+	+	-	+	-	-
07/MD	+	+	-	+	-	-
08/MD	+	+	-	+	-	-
09/MD	+	+	-	+	-	-
10/MD	+	-	-	+	-	-
12/MD	+	+	-	+	-	-
14/MD	+	+	-	+	-	-
15/MD	+	+	-	+	-	-
16/MD	+	+	-	+	-	-
17/MD	+	+	-	+	-	-

Si riporta di seguito il calcolo della statistica K per laboratorio e quella complessiva del circuito MD1-10

10.2. Circuito MD1-10

Codice Laboratorio: MD/02

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/03

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Codice Laboratorio: MD/04

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/05

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/06

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/07

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/08

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/09

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Codice Laboratorio: MD/10

Expected Agreement	Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
83.33%	50.00%	0.6667	0.3849	1.73	0.0416

Codice Laboratorio: MD/12

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/14

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/15

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/16

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Codice Laboratorio: MD/17

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.4082	2.45	0.0072

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

10.3. Kappa complessivo circuito MD1-10

. Calcolo del valore k su tutti i laboratori

Kappa	Z	Prob>Z
0.9555	23.82	0.0000

(Leggenda: Agreement = accordo osservato; Expected = accordo atteso; kappa = statistica kappa di Cohen; std.Err. = errore standard della statistica Kappa; z = statistica test per verificare l'ipotesi nulla H0= assenza di accordo; Prob>Z = livello di significatività della statistica Z)

10.4. Riassunto dei risultati

Laboratorio	MD_2	MD_3	MD_4	MD_5	MD_6
kappa	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
p-value	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007

Laboratorio	MD_7	MD_8	MD_9	MD_10	MD_12
kappa	1.00	1.00	1.00	0.6571	1.00
p-value	0.007	0.007	0.007	0.0416	0.007

Laboratorio	MD_14	MD_15	MD_16	MD_17	MD 1-10
kappa	1.00	1.00	1.00	1.00	0.9555
p-value	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000

Note: per l'interpretazione dei valori del K di Cohen si rimanda alla scala di *Landis & Koch*

11. Circuito MD1-10: conclusioni ed osservazioni

Tutti i Laboratori hanno mostrato un'**ottima** concordanza, ad esclusione del Laboratorio MD/10 (**buona** concordanza).

La concordanza complessiva del circuito (**MD1/10**) è **ottima**.

Ogni concordanza calcolata è significativa (P-value <0.05) quindi non dovuta al caso.

Osservazioni: 1) su 14 laboratori partecipanti, 8 hanno dichiarato di utilizzare un ceppo di riferimento (NCTC 11184, NCTC 9148, ATCC 35865) per il controllo di qualità.

2) i campioni prova impiegano in media 48 ore per giungere a destinazione e in ogni caso arrivano al laboratorio entro le 72 ore (se compreso il fine settimana).

3) la maggior parte dei laboratori inizia la prova entro la prima settimana dal ricevimento dei campioni prova. Nella distribuzione di febbraio 2010, tuttavia, tre laboratori hanno iniziato la prova dopo 9, 12 e 13 giorni rispettivamente.

4) notevole variabilità nelle condizioni di atmosfera modificata cui vengono incubati i terreni colturali:

a) uso di kit per microaerofilia con conseguenti basse concentrazioni di O₂ (Kit Campygen).

b) utilizzo di incubatori con atmosfera arricchita di CO₂ a diverse concentrazioni dichiarate (5-8-10% e di CO₂ Gen).

5) un laboratorio partecipante ha segnalato la presenza di muffe in uno dei campioni prova.

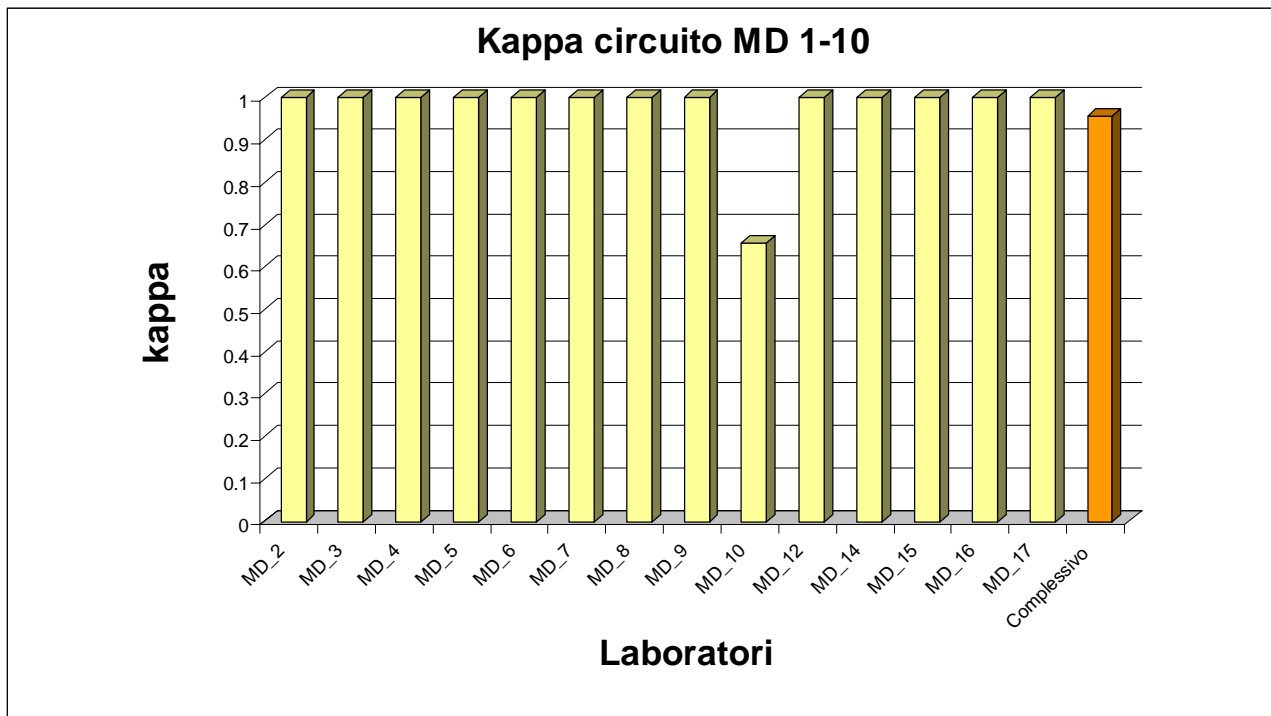


Figura 2: Kappa circuito MD1-10

11.1. Kappa complessivo 2007-2010.

Kappa complessivo del circuito interlaboratorio dal 2007 al 2010 (prima distribuzione): si nota un costante aumento (tendenza) nel corso degli anni, dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte qualitative fornite dai laboratori partecipanti e i valori attesi, che si mantengono comunque ad un livello molto elevato (prossimi a 1).

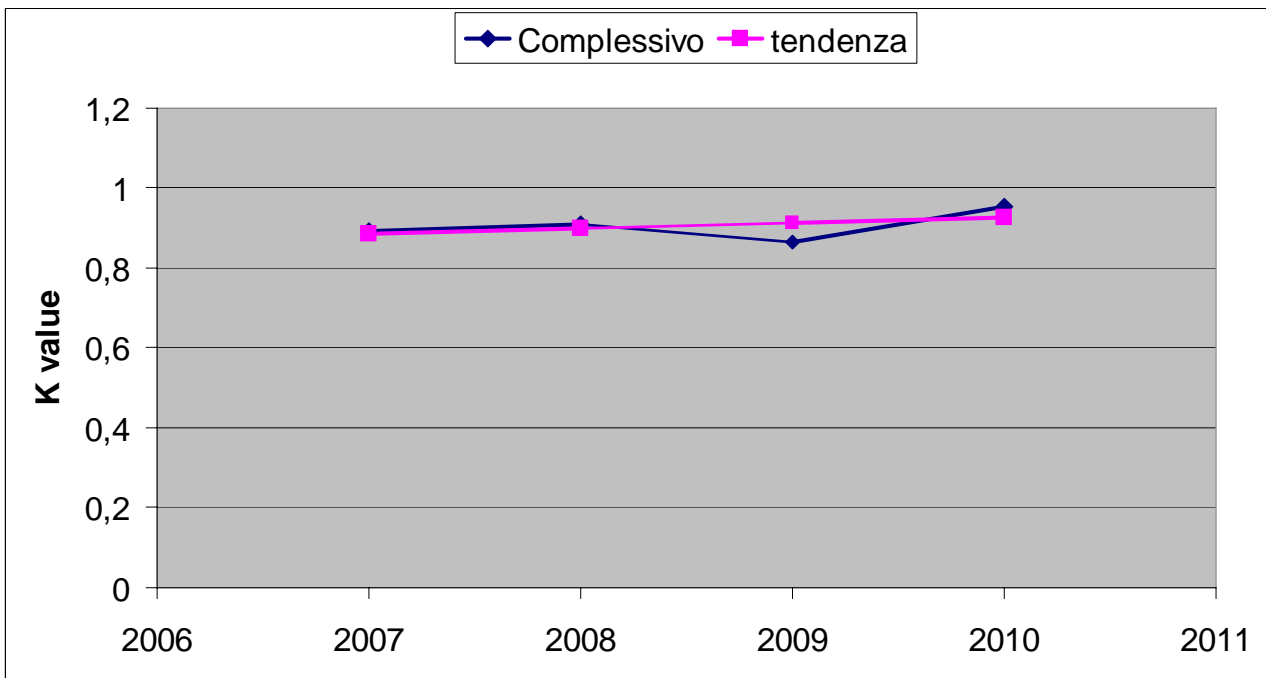


Figura 3: Kappa complessivo 2007-2010

12. Circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica:
Sensibilità, specificità ed accuratezza.

Caratteristiche del circuito
ricerca *Tylorella equigenitalis*

valore rilevato	Valore assegnato	
	presente	assente
presente	375	2
assente	31	399

specificità	1 ± 0,01
sensibilità	0,92 ± 0,03
accuratezza	0,96 ± 0,01

Sensibilità: capacità di identificare correttamente i campioni positivi.

La sensibilità nella tabella è data da: $375/(375+31)$: dove 375 sono i campioni positivi trovati dai laboratori e (375+31) sono i campioni effettivamente positivi distribuiti nel corso degli anni.

Specificità: capacità di identificare correttamente i campioni negativi.

La specificità nella tabella è data da: $399/(2+399)$: dove 2 sono i campioni negativi riportati come positivi e (2+399) sono i campioni effettivamente negativi distribuiti nel corso degli anni.

Sensibilità e specificità, sono definite attraverso una proporzione e quindi assumono valori compresi fra 0 e 1.

Accuratezza: è il grado di corrispondenza tra il dato atteso e quello effettivamente riscontrato.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

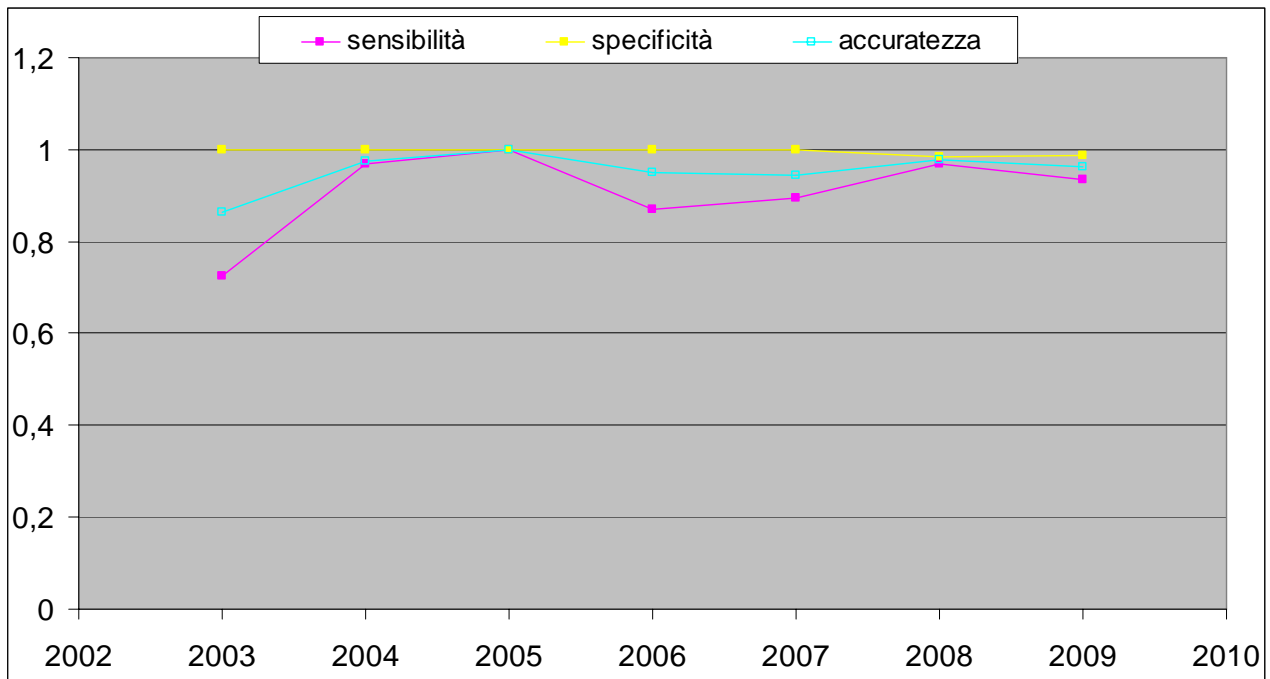


Figura 4: trend della sensibilità, specificità ed accuratezza dal 2003 al 2010 (prima distribuzione)

La sensibilità e la specificità del circuito interlaboratorio sono state rispettivamente del 92% e del 100%; l'accuratezza del 96%.

In totale sono stati esaminati dal 2003 al 2010 (prima distribuzione): 807 campioni prova di cui 406 campioni con presenza di *Taylorella equigenitalis* e 401 campioni negativi.

Data report 10/05/2010

SCT 3 - Laboratorio Diagnostica Clinica –Padova
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Viale dell'Università n° 10, 35020 Legnaro (PD)
Dr.ssa Michela Corró ☎e-mail: mcorro@izsvenezie.it
☎ (+39) 0498084294 Fax(+39) 0498830277