

*Ottobre 2011*

# **Risultati Circuito MD 2011**

## **Schema microbiologia diagnostica**

---

**Circuito Interlaboratorio AQUA**  
**Distribuzione Microbiologia Diagnostica**

Ricerca di: *Taylorella equigenitalis*

ANNO 2011

## 1. Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, ricerca *Taylorella equigenitalis*, organizzato dal Laboratorio di Padova – Struttura Complessa Territoriale 3, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie è nato dall'esigenza 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, per evidenziare problematiche operative nei confronti delle quali mettere in atto azioni correttive, per garantire l'assicurazione qualità dei risultati e 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 secondi applicano le rispettive procedure per l'analisi dei campioni.

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

Il circuito comprende una distribuzione/anno costituita da 10 liofilizzati prodotti con le seguenti caratteristiche: colture pure di *Taylorella equigenitalis*; colture miste di uno o più ceppi batterici associati o meno a *Taylorella equigenitalis*, campioni sterili e flora microbica mista ottenuta da tamponi prepuziali di equino.

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 ripetute 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.

In allegato ai campioni prova viene inviata la seguente documentazione: scheda di sicurezza, istruzioni per la conservazione e il ripristino del liofilizzato, modulistica da compilare per la registrazione dei risultati.

I risultati dei laboratori partecipanti sono 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.
- 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” (2008) OIE, chapter 2.5.2
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura
- ISO/IEC 17043:2010 “Conformity assessment – General requirements for proficiency testing”

## 3. Composizione dei campioni prova

### Circuito MD 2011

N° identificativo	Contenuto
<b>A/11</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184
<b>B/11</b>	Flora microbica da prepuzio di equino
<b>C/11</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<b>D/11</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<b>E/11</b>	Sterile
<b>F/11</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Candida tropicalis</i> 3636/P07
<b>G/11</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212; <i>Candida tropicalis</i> 3636/P07
<b>H/11</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<b>I/11</b>	Flora microbica da prepuzio di equino
<b>L/11</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; Flora microbica da prepuzio di equino

## 4. Indicazioni generali

### 4.1 Raccomandazioni

- Inizio prova entro 10 giorni dalla data di distribuzione

### 4.2 Preparazione del campione

- Aggiungere al campione liofilizzato 2,0 ml di brodo nutriente sterile
- Lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti
- Mescolare accuratamente fino a completa solubilizzazione
- Seminare i terreni colturali
- Ulteriori indicazioni per la manipolazione dei campioni 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: “**presente**”, nel caso sia evidenziata la presenza di *Taylorella equigenitalis*; “**assente**”, 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 risultato atteso.

## 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 Dr.ssa Michela Corrò

e-mail [mcorro@izsvenezie.it](mailto:mcorro@izsvenezie.it)

Responsabile tecnico Sig.ra Silvia Friso

e-mail [sfriso@izsvenezie.it](mailto:sfriso@izsvenezie.it)

Responsabile statistico Dr.ssa Marzia Mancin

e-mail [crev.mmancin@izsvenezie.it](mailto:crev.mmancin@izsvenezie.it)

Assicuratore Qualità Dr. Luciano Iob

e-mail [liob@izsvenezie.it](mailto:liob@izsvenezie.it)

9. Laboratori partecipanti

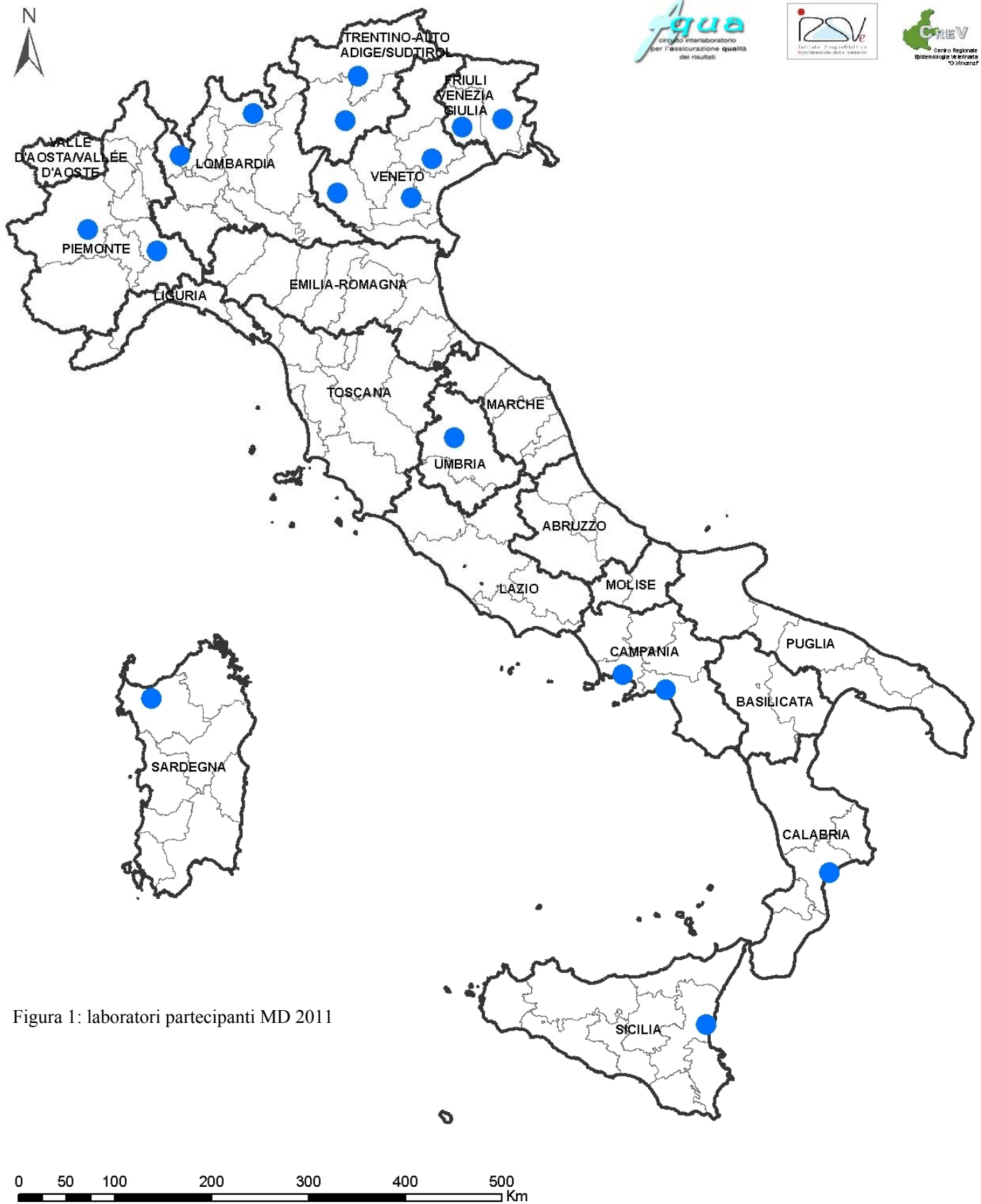


Figura 1: laboratori partecipanti MD 2011

# Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

## 10. Risultati

### 10.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante

CIRCUITO INTERLABORATORIO MD 2011										
N° identificativo	A/11	B/11	C/11	D/11	E/11	F/11	G/11	H/11	I/11	L/11
<b>Risultato atteso</b>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
03/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
04/MD	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
05/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
06/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
07/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
08/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
10/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
12/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
13/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
15/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
16/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
17/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
19/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
21/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
22/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
23/MD	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
24/MD	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+

### 10.2 Statistica K di Cohen

Si riporta di seguito il calcolo della statistica K per laboratorio partecipante e K complessivo

**Codice Laboratorio: MD/03**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

**Codice Laboratorio: MD/04**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	50.00%	0.8000	0.3098	2.58	0.0049

# Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

## Codice Laboratorio: MD/05

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/06

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/07

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/08

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/10

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/12

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/13

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008



# Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

## Codice Laboratorio: MD/15

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/16

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/17

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/19

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/21

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/22

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## Codice Laboratorio: MD/23

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	50.00%	0.8000	0.3098	2.58	0.0049

# Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Codice Laboratorio: MD/24

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	50.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

## KAPPA COMPLESSIVO

Calcolo del valore k su tutti i laboratori

Kappa	Z	Prob>Z
0.9581	37.48	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)

### 10.3 Riassunto dei risultati

Laboratorio	03/MD	04/MD	05/MD	06/MD	07/MD
kappa	1,00	0.80	1,00	1,00	1,00
p-value	0,0008	0,0049	0,0008	0,0008	0,0008

Laboratorio	08/MD	10/MD	12/MD	13/MD	15/MD
kappa	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008

Laboratorio	16/MD	17/MD	19/MD	21/MD	22/MD
kappa	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008

Laboratorio	23/MD	24/MD	Complessivo
kappa	0,80	1,00	0,9581
p-value	0,0049	0,0008	0,0000

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

11.Circuito interlaboratorio MD 2011: conclusioni ed osservazioni

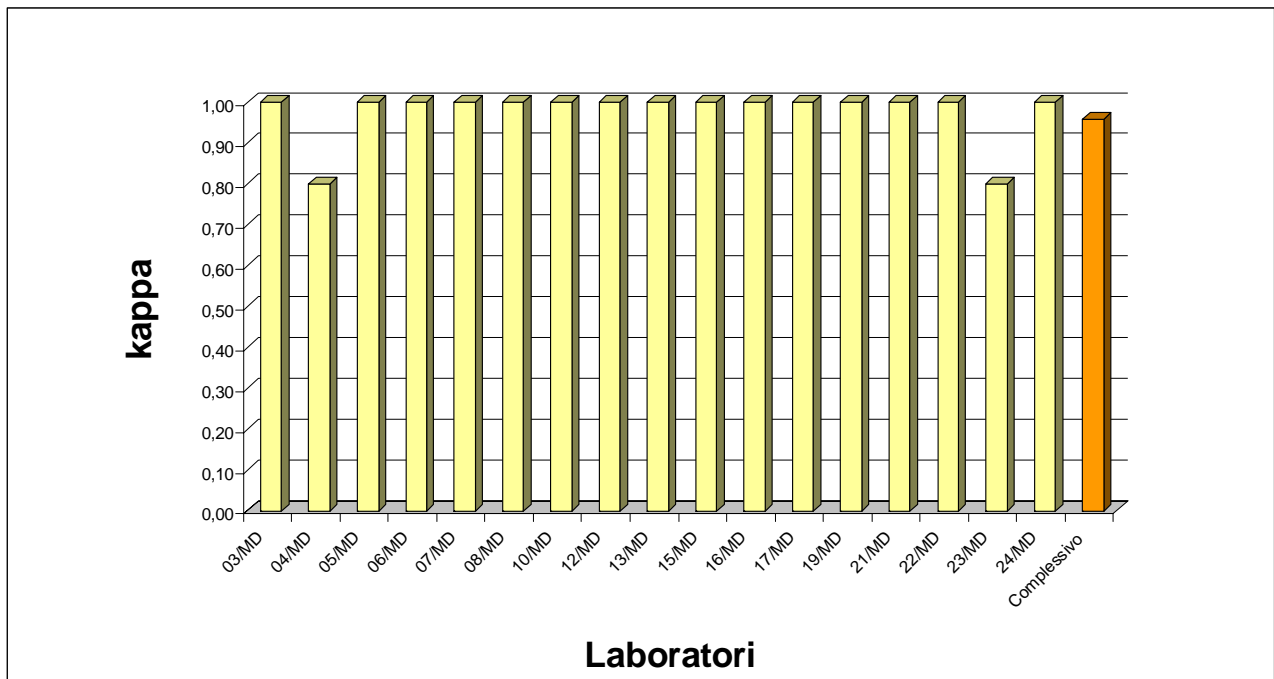


Figura 2: valori di Kappa dei laboratori partecipanti e Kappa complessivo MD 2011

I laboratori MD/04 e MD/23, valutando il valore k nella scala di *Landis & Koch*, mostrano una **buona** concordanza, con un p-value minore della soglia di 0,05 e quindi non dovuta al caso.

Tutti gli altri laboratori hanno mostrato un'**ottima** concordanza con p-value <0,05 e quindi non dovuta al caso.

La concordanza complessiva del circuito (colonna arancione) è **ottima**  
Ogni concordanza calcolata è significativa (P-value <0.05) quindi non dovuta al caso.

12. Kappa complessivo 2007-2011.

Kappa complessivi dei circuiti interlaboratorio MD dal 2007 al 2011: si rileva un costante aumento (tendenza, evidenziato in rosa) nel corso degli anni, dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte qualitative fornite dai laboratori partecipanti e i valori attesi, che si mantiene sempre ad un valore molto elevato (prossimo a 1).



Figura 3: Kappa complessivo 2007-2011

13. Sensibilità, specificità ed accuratezza.

**Caratteristiche del circuito**  
ricerca *Taylorella equigenitalis*

valore rilevato	Valore assegnato	
	presente	assente
presente	509	4
assente	31	541

specificità	0,99 ± 0,01
sensibilità	0,94 ± 0,02
accuratezza	0,97 ± 0,01

Figura 4: Sensibilità, specificità ed accuratezza

**Sensibilità:** capacità d’identificare correttamente i campioni positivi.

La sensibilità nella tabella è data da:  $509/(509+31)$ : dove 509 sono i campioni positivi correttamente identificati, 31 i campioni positivi riportati come negativi dai laboratori partecipanti e  $(509+31=540)$  i campioni effettivamente positivi distribuiti nel corso degli anni.

**Specificità:** capacità d’identificare correttamente i campioni negativi.

La specificità nella tabella è data da:  $541/(4+541)$ : dove 541 sono i campioni negativi correttamente identificati, 4 sono i campioni negativi riportati come positivi dai laboratori partecipanti e  $(4+541=545)$  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.

L’accuratezza nella tabella è data da:  $(509+541)/1085$ : dove  $(509+541)$  sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati riportati dai laboratori partecipanti e 1085 sono i campioni-prova **totali** distribuiti.

La sensibilità e la specificità del circuito interlaboratorio sono state rispettivamente del 94% e del 99%; l’accuratezza del 97%.

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

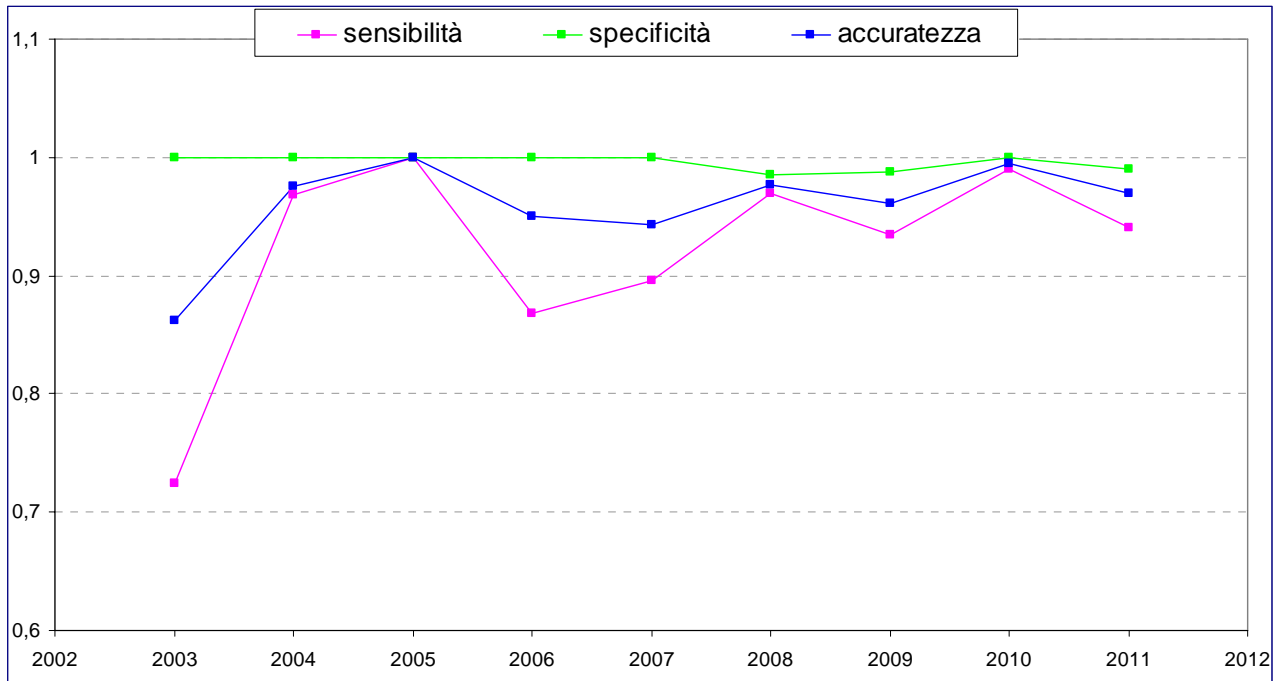


Figura 5: trend della sensibilità, specificità ed accuratezza dal 2003 al 2011

In totale sono stati esaminati n° 1085 campioni prova di cui 540 positivi per *Taylorella equigenitalis* e 545 negativi.

### Data report 31/12/2011

SCT 3 - Laboratorio Diagnostica Clinica –Padova  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie  
Viale dell'Università n° 10, 35020 Legnaro (PD)

Dr.ssa Michela Corrò

☎ (+39) 0498084294 Fax (+39) 0498830277

✉ e-mail: [mcorro@izsvenezie.it](mailto:mcorro@izsvenezie.it)

**Allegato al report MD 2011**

1. Introduzione

Prova sperimentale per la determinazione del LOD (Limite Of Detection).

Per effettuare tale prova si è utilizzato un liofilizzato a concentrazione titolata di  $10^4$  UFC di *Taylorella equigenitalis*; inoltre ad ogni laboratorio sono state inviate 10 piastre di terreno CEMO appartenenti tutte allo stesso lotto di produzione, al fine di uniformare le condizioni di prova.

I risultati di ogni laboratorio sono stati confrontati con la mediana ottenuta da tutti i risultati dei partecipanti.

2. Definizioni

**LOD (Limit Of Detection):** inteso come la più alta diluizione seriale del campione prova in cui è ancora possibile rilevare la presenza di *Taylorella equigenitalis*.

**Percentile:** definito come il valore che divide una serie ordinata di osservazioni in 100 parti uguali, per esempio un percentile di ordine  $\alpha$ , è il valore Q che divide la popolazione in due parti proporzionali ad  $\alpha$  e  $(1-\alpha)$ , caratterizzate da valori rispettivamente minori e maggiori di Q.

**Mediana:** è il valore centrale che lascia a destra e a sinistra (o sopra e sotto) il 50% delle osservazioni.

3. Indicazioni generali

3.1 Composizione del liofilizzato

Identificativo	Contenuto
LOD	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; flora microbica da prepuzio di equino

3.2 Preparazione e semina del campione

- Aggiungere al campione liofilizzato 2,0 ml di brodo nutriente sterile (soluzione madre 1:1).
- Lasciare il campione a temperatura ambiente per 5-10 minuti.
- Mescolare accuratamente fino a completa solubilizzazione.
- Preparare diluizioni seriali in base 10.
- Seminare 100  $\mu$ l di ogni diluizione da  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  nelle piastre di CEMO agar.
- Procedere come previsto dalla procedura per la ricerca *Taylorella equigenitalis*.

4. Risultati

Laboratorio	03/MD	04/MD	05/MD	06/MD	07/MD	08/MD	10/MD	12/MD	13/MD
LOD	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$	$7 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$30 \times 10^2$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^3$

Laboratorio	15/MD	16/MD	17/MD	19/MD	21/MD	22/MD	23/MD	24/MD
LOD	$2 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^4$

## 5. Analisi statistica dei dati

### 5.1 Elaborazione statistica

Per l'elaborazione dei risultati si sono utilizzati i seguenti parametri:

**mediana**, definita come il valore che occupa la posizione centrale delle osservazioni disposte in ordine crescente, è utilizzata come parametro di confronto per la sua robustezza (linea blu);

**percentile**, definito come il valore che divide una serie ordinata di osservazioni in 100 parti uguali; nel nostro caso si è scelto il 5° e il 95° percentile, utilizzati per individuare l'intervallo all'interno del quale ricade il 90% delle osservazioni dei laboratori partecipanti (tratteggio rosso);

**coefficiente di variazione (CV)**, definito come il rapporto percentuale tra la deviazione standard e la media delle osservazioni, è un numero puro che fornisce un'indicazione della variabilità delle osservazioni rilevate.

Parametri	Log <sub>10</sub> .LOD
N° laboratori	17
Mediana	4,48
5° percentile	4,00
95° percentile	4,60
Deviazione standard	0,69
Media	4
Coefficiente di variazione (CV)	15.88%

### 5.2 Rappresentazione grafica dei risultati (figura 1 e 2)

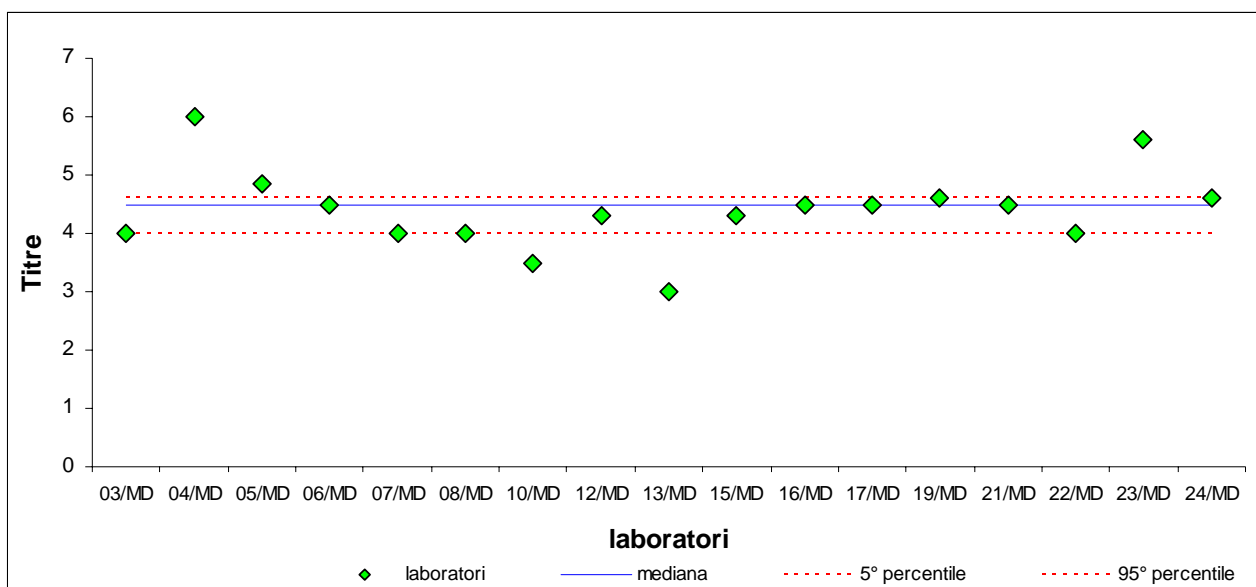


Figura 1: risultati dei laboratori partecipanti espressi con log<sub>10</sub>



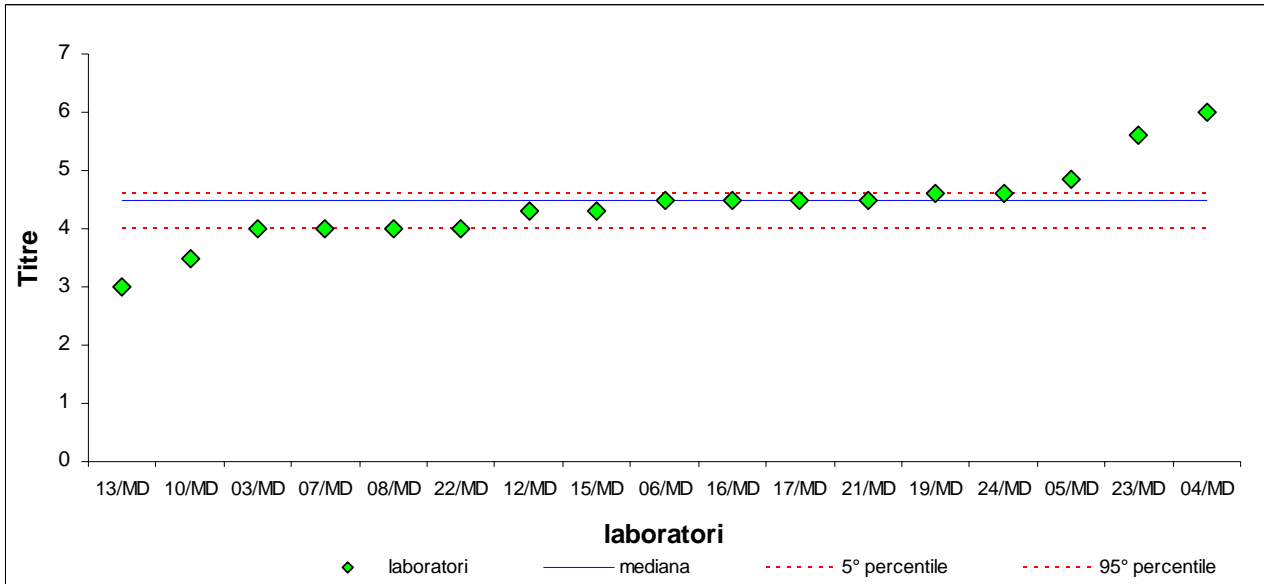


Figura 2: risultati ordinati in funzione della grandezza, espressi con log<sub>10</sub>

## 6. Caratteristiche del campione prova

Si riporta di seguito l'elaborazione statistica dei dati con il relativo grafico (figura 3) delle prove di ripetibilità eseguite sul campione-prova utilizzato per la determinazione del LOD:

Parametri	Log <sub>10</sub> .LOD
N° repliche	10
Mediana	4,29
5° percentile	3,8
95° percentile	5
Deviazione standard	0,46
Media	4,39
Coefficiente di variazione (CV)	10,57%

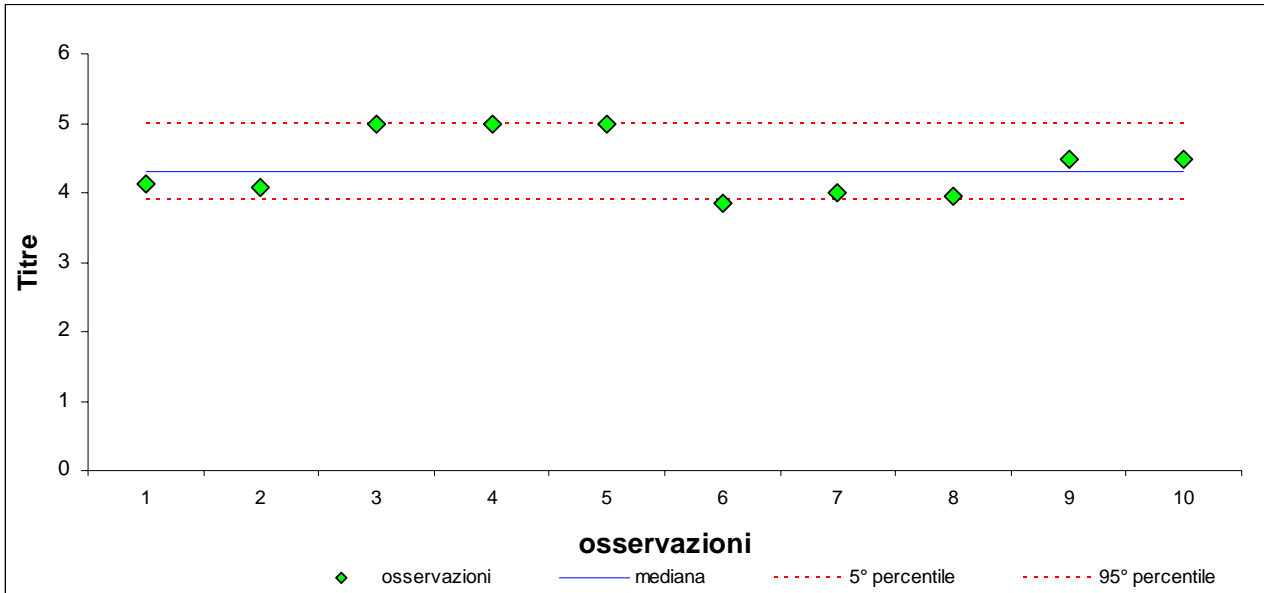


Figura 3: risultati delle 10 repliche (ripetibilità) eseguite sul campione prova, espressi con  $\log_{10}$

## 7. Discussione

Come si può notare dai dati sopra riportati (figura 1 e 2), i laboratori 10 e 13 tendono a sottostimare il LOD, mentre i laboratori 4, 5 e 23 a sovrastimarli.

I valori relativamente bassi del coefficiente di variazione (CV) calcolato sia per le prove eseguite dai laboratori partecipanti,  $CV = 15,88\%$ , sia per le repliche sul campione-prova (figura 3) effettuate dal laboratorio organizzatore,  $CV = 10,57\%$ , indicano una limitata variabilità dei risultati e quindi una buona riproducibilità tra laboratori e ripetibilità del campione-prova.