

Risultati Circuito MD 2015

Schema Microbiologia Diagnostica

Circuito Interlaboratorio AQUA
Schema Microbiologia Diagnostica

Ricerca di: *Taylorella equigenitalis*

ANNO 2015

1. Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, ricerca *Taylorella equigenitalis*, organizzato dal Laboratorio di Diagnostica Clinica 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, un importante momento 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 PDP DIA 03, redatta secondo le linee guida indicate nel Manuale OIE; i secondi applicano le rispettive procedure di prova in uso presso il laboratorio.

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 campioni prova prodotti con le seguenti caratteristiche: colture pure di *Taylorella equigenitalis*; colture miste di uno o più ceppi batterici o flora microbica ottenuta da tamponi prepuziali di equino associati o meno a *Taylorella equigenitalis*, campioni sterili.

Per ogni lotto di campioni-prova prodotto, sono eseguite prove di omogeneità e di stabilità. Tali prove sono effettuate su tutti i lotti scelti per il circuito e ripetute, quotidianamente, dal giorno di spedizione a quello previsto per l'inizio delle prove, a garanzia della stabilità dei campioni prova fino al momento dell'utilizzo da parte dei laboratori partecipanti.

I campioni prova, opportunamente identificati, sono inviati a temperatura controllata ($+5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$), mediante corriere, rispettando le condizioni previste dalla normativa vigente riguardante il trasporto di materiale biologico e la documentazione relativa.

Sul sito AQUAWEB dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (www.izsvenezie.it) sono disponibili i documenti di carattere generale del circuito AQUA (organizzazione, scheda di sicurezza) e i documenti specifici dello schema Microbiologia Diagnostica MD 1 (istruzioni d'uso, modalità per l'inserimento dei risultati, report).

I risultati dei laboratori partecipanti sono elaborati statisticamente, utilizzando la statistica K di Cohen (K) che permette di valutare il grado di concordanza tra risultati attesi e risultati del singolo laboratorio; è stato inoltre calcolato un K complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

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” (2012) 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”
- Mancin M, Barco L, Saccardin C., Ricci A. Proposed statistical analysis to evaluate qualitative proficiency testing of Salmonella serotyping. *Accred Qual Assur* (2015) 20:305-310

3. Composizione dei campioni prova

Campioni prova	Composizione MD1-2015
A/15	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184
B/15	Sterile
C/15	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Escherichia coli</i> rif. 4393/15 (17/L15)
D/15	Sterile
E/15	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Escherichia coli</i> rif. 4393/15 (17/L15)
F/15	Sterile
G/15	Flora microbica da prepuzio di equino II (14/L12)
H/15	<i>Taylorella equigenitalis</i> ceppo di campo rif. 5994/12 (15/L13)
I/15	Sterile
L/15	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; Flora microbica da prepuzio di equino I (12/L11)

4. Indicazioni generali

4.1 Allestimento dei campioni prova

1. Preparazione delle sospensioni batteriche, costituite da flora microbica prepuziale ottenuta valutando più tamponi prepuziali equini, risultati negativi per la ricerca di *T. equigenitalis*
2. Identificazione di massima delle specie microbiche presenti nelle selezioni di flora prepuziale
3. Preparazione delle sospensioni di flora microbica con concentrazioni diverse di *T. equigenitalis* per verificarne la stabilità

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

4. Valutazione della crescita in piastra dei diversi ceppi e selezione delle combinazioni batteriche in grado di garantire la presenza nella matrice “tampono” di un numero sufficiente di colonie di *T. equigenitalis* per poter essere individuate tra la flora microbica competitiva.
5. Allestimento delle matrici “tampono” mediante breve immersione fino a imbibizione del tampono nelle sospensioni batteriche selezionate e inserimento del tampono nella provetta contenente terreno di Stuart con carbone.
6. Verifica della vitalità e della stabilità della componente microbica nella matrice tampono, con prove di crescita effettuate al momento della preparazione e a 24, 48, 72 e 96 ore dalla preparazione/distribuzione dei tamponi.

4.2 Raccomandazioni

- **Inizio della prova entro 48 ore dalla data di preparazione/distribuzione dei tamponi**

4.3 Gestione dei campioni prova

- Semina dei campioni prova entro 48 ore dalla data di preparazione/distribuzione (intesa come data del prelievo) analogamente a quanto previsto per i tamponi genitali equini.
- Utilizzo delle procedure di prova in uso presso il laboratorio.

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 K 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 e abbreviazioni

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

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

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 AQUA-MD Dr.ssa Michela Corrò e-mail mcorro@izsvenezie.it

Responsabile tecnico Dr. Roberto Perin e-mail rperin@izsvenezie.it

Responsabile statistico Dr.ssa Marzia Mancin e-mail mmancin@izsvenezie.it

Assicuratore Qualità Dr. Luciano Iob e-mail liob@izsvenezie.it

9. Laboratori partecipanti

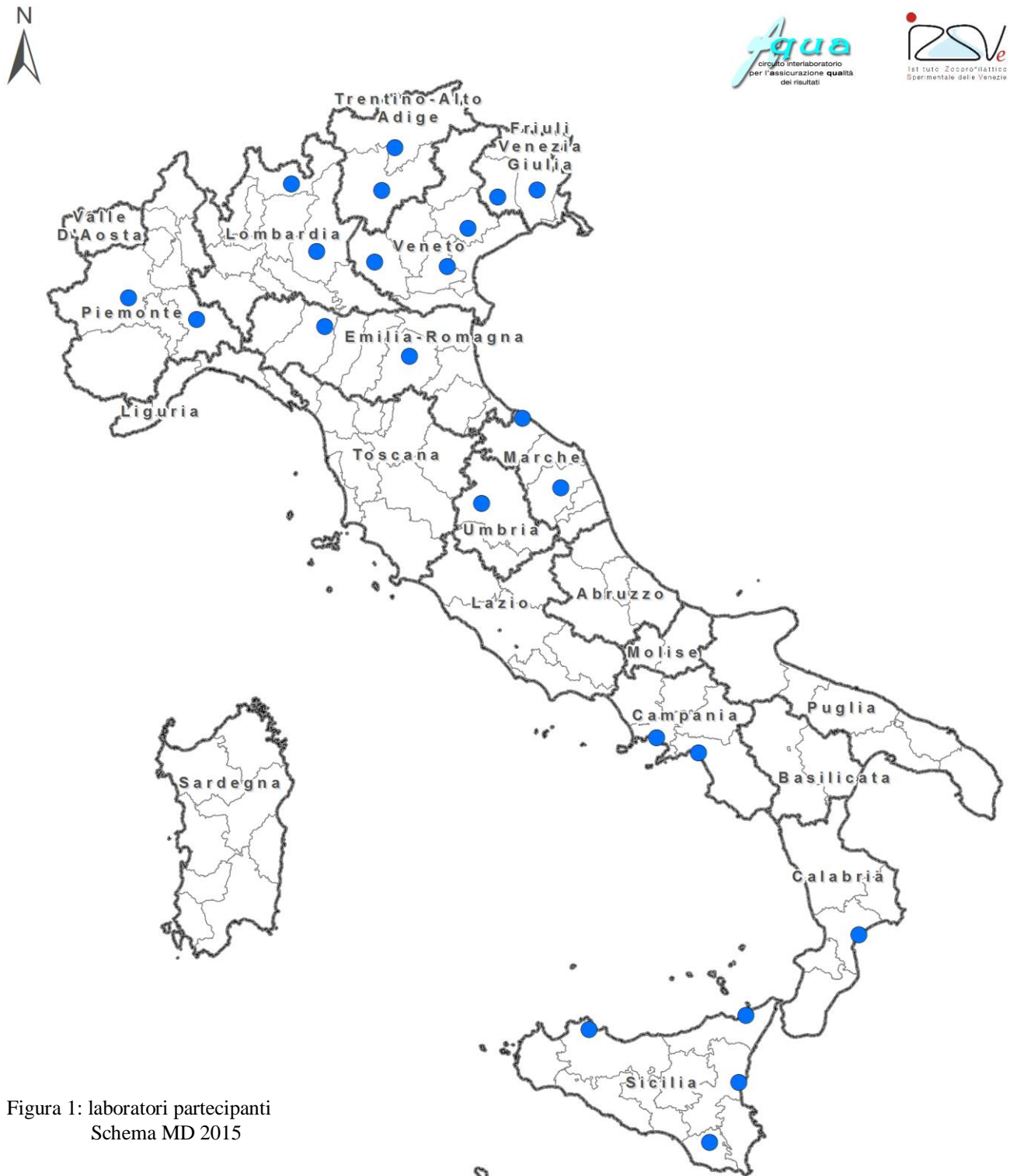


Figura 1: laboratori partecipanti
Schema MD 2015

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

10. Risultati

10.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante

CIRCUITO INTERLABORATORIO MD1-2015										
Codice Identificativo	A/15	B/15	C/15	D/15	E/15	F/15	G/15	H/15	I/15	L/15
Risultato atteso	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000332	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000336	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
L000342	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
L000348	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000352	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000359	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000375	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
L000383	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000384	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
L000389	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000390	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000392	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000396	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
L000415	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
L000432	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000437	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000440	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000455	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000456	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000465	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
L000485	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
L000503	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
L000538	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
corretto/totale	22/23	20/23	20/23	23/23	20/23	23/23	20/23	20/23	23/23	20/23

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

10.2 Statistica K di Cohen

Si riporta di seguito il calcolo della statistica K di Cohen per valutare la concordanza tra esito atteso e risultato del laboratorio partecipante e il K di Cohen complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

. kap atteso 1000332

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

. kap atteso 1000336

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
80.00%	50.00%	0.6000	0.2898	2.07	0.0192

. kap atteso 1000342

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
70.00%	50.00%	0.4000	0.3098	1.29	0.0984

. kap atteso 1000348

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

. kap atteso 1000352

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

. kap atteso 1000359

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

. kap atteso 1000375

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
60.00%	50.00%	0.2000	0.2898	0.69	0.2451

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

. kap atteso 1000383

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

. kap atteso 1000384

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
80.00%	50.00%	0.6000	0.3162	1.90	0.0289

. kap atteso 1000389

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

. kap atteso 1000390

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

. kap atteso 1000392

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

. kap atteso 1000396

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

. kap atteso 1000415

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
60.00%	50.00%	0.2000	0.3162	0.63	0.2635

. kap atteso 1000432

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

. kap atteso 1000437

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

. kap atteso 1000440

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

. kap atteso 1000455

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

. kap atteso 1000456

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

. kap atteso 1000465

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

. kap atteso 1000485

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

. kap atteso 1000503

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

. kap atteso 1000538

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

(Leggenda: Agreement = accordo osservato; Expected = accordo atteso; kappa = statistica K 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

Kappa complessivo

Kappa	Z	Prob>Z
0.6969	35.05	0.0000

	L000332	L000336	L000342	L000348	L000352	L000359	L000375	L000383
K per genere	1.00	0.60	0.40	1.00	1.00	1.00	0.20	1.00
p-value	0.0008	0.0192	0.0984	0.0008	0.0008	0.0008	0.2451	0.0008
	L000384	L000389	L000390	L000392	L000396	L000415	L000432	L000437
K per specie	0.60	1.00	1.00	1.00	0.80	0.20	1.00	1.00
p-value	0.2890	0.0008	0.0008	0.0008	0.0049	0.2635	0.0008	0.0008
	L000440	L000455	L000456	L000465	L000485	L000503	L000538	Complessivo
K per specie	1.00	1.00	1.00	0.80	0.80	1.00	0.80	0.6969
p-value	0.0008	0.0008	0.0008	0.0049	0.0049	0.0008	0.0049	0.0000

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

Nella valutazione dell'accordo tra osservato e atteso in termini di identificazione della presenza di *Taylorella equigenitalis*, i laboratori L00375 e L000415 mostrano un accordo dovuto al caso (p-value>0.10), mentre il laboratorio L000342 mostra un accordo discreto con l'esito atteso; i laboratori L000336 e L000384 mostrano un accordo moderato, i laboratori L000396, L000465, L000538 e L000485 un buon accordo e i restanti laboratori (n.15) un ottimo accordo con l'esito atteso. Questi ultimi valori sono significativi e quindi non dovuti al caso.

L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori è buono e significativo e quindi non dovuto al caso.

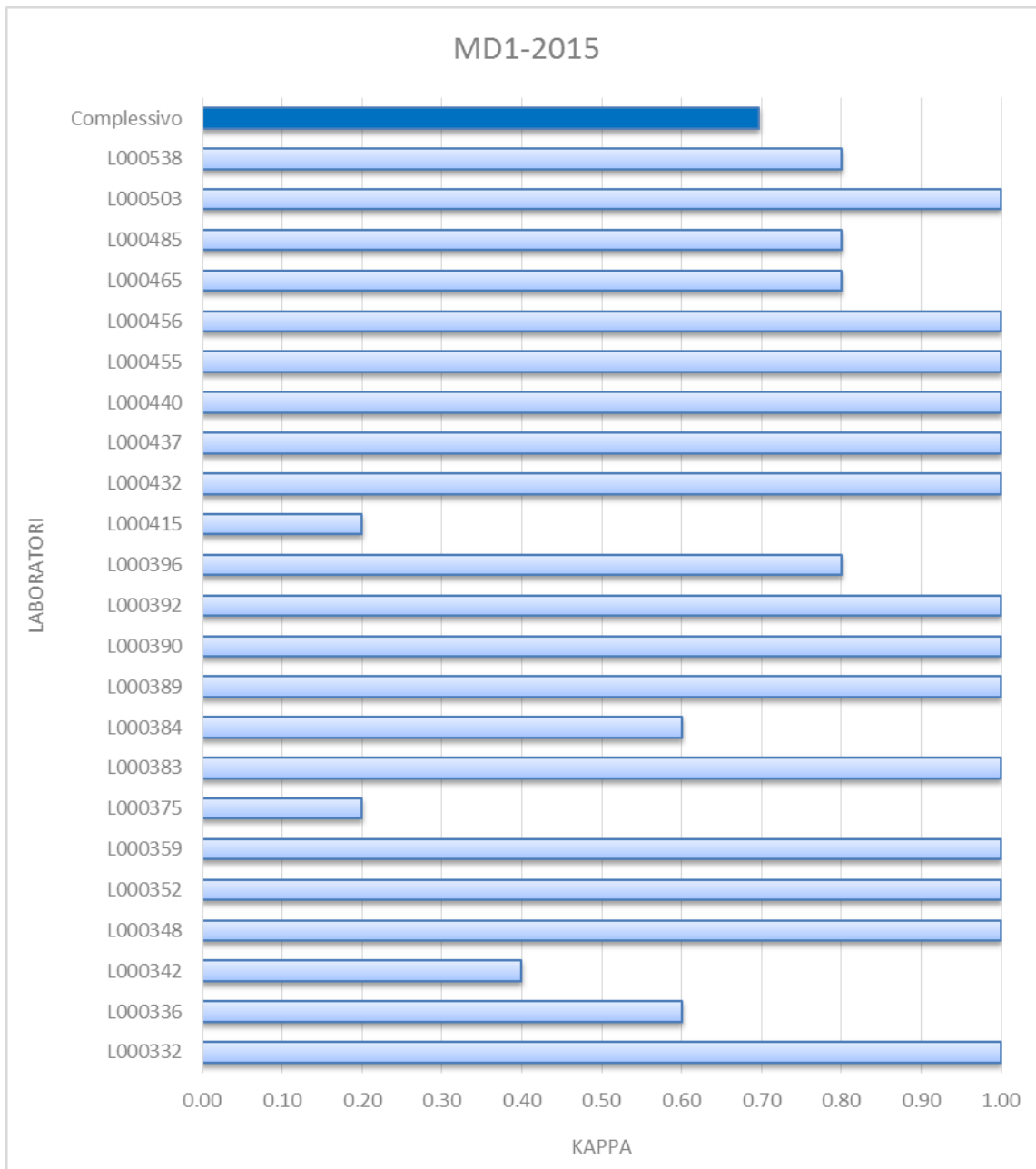


Figura 2: rappresentazione grafica dei valori di Kappa ottenuti dalla concordanza tra esito atteso e risultati dei laboratori partecipanti, (in azzurro) K dei singoli laboratori e Kappa complessivo (in blu), dello Schema MD1 2015

11 Altre elaborazioni

11.1. Sensibilità, specificità e accuratezza.

Caratteristiche del circuito
ricerca *Taylorella equigenitalis*

valore rilevato	Valore assegnato	
	presente	assente
presente	884	20
assente	76	925
subtotale	960	945
totale		1905

specificità	0,98 ± 0,01
sensibilità	0,92 ± 0,02
accuratezza	0,95 ± 0,01

Figura 3: Sensibilità, specificità e accuratezza

Sensibilità: capacità d'identificare correttamente i campioni positivi.

La sensibilità nella tabella è data da: $884/(884+76)$: dove **884** sono i campioni positivi correttamente identificati, **76** i campioni positivi riportati come negativi dai laboratori partecipanti e $(884+76)$ 960 i campioni effettivamente positivi distribuiti nel corso degli anni.

Specificità: capacità d'identificare correttamente i campioni negativi.

La specificità nella tabella è data da: $925/(20+925)$: dove **925** sono i campioni negativi correttamente identificati, **20** sono i campioni negativi riportati come positivi dai laboratori partecipanti e $(20+925)$ 945 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: $(884+925)/1905$: dove $(884+925)$ sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati riportati dai laboratori partecipanti e **1905** sono i campioni-prova **totali** distribuiti.

La sensibilità e la specificità del circuito interlaboratorio sono state rispettivamente del 92% e del 98%; l'accuratezza del 95%.

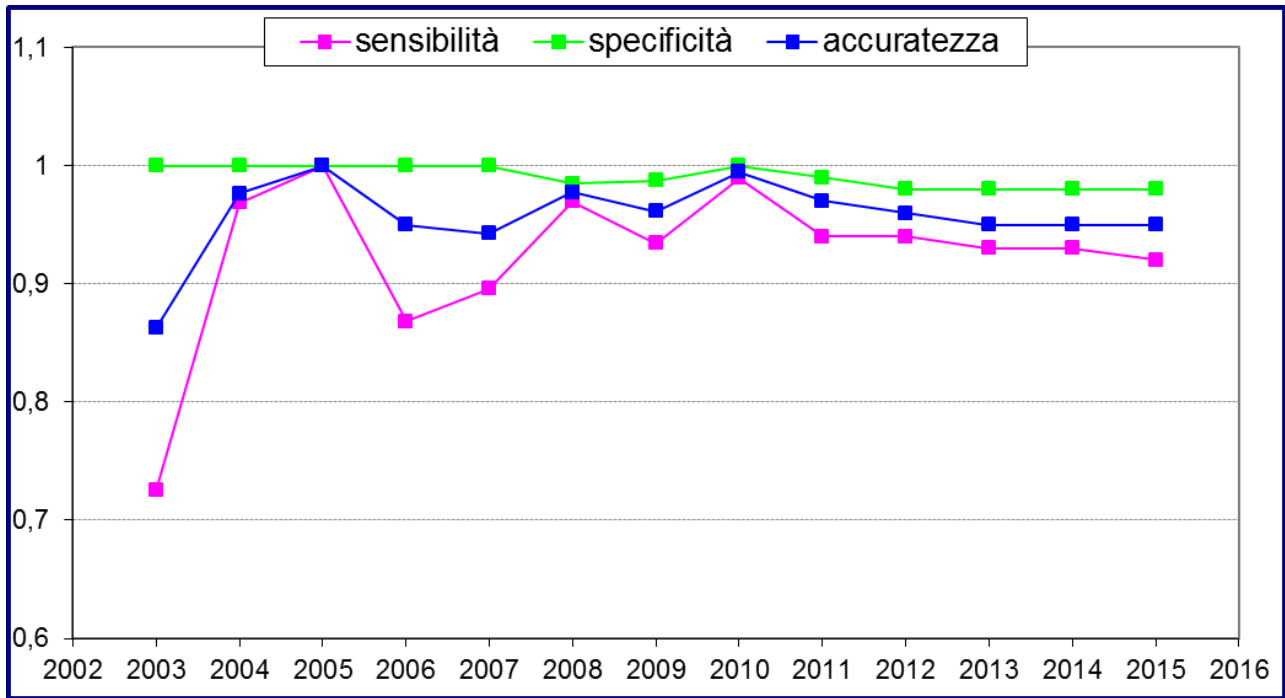


Figura 4: andamento della sensibilità, specificità e accuratezza dal 2003 al 2015

In totale sono stati esaminati n° 1905 campioni prova di cui 960 positivi per *Tylorella equigenitalis* e 945 negativi.

11.2 Tempistiche inizio prova

Tutti i laboratori partecipanti hanno ricevuto i campioni prova entro le 24 ore dalla spedizione ad eccezione di quattro laboratori che hanno ricevuto i campioni entro 48 ore. Quindici laboratori hanno iniziato la prova il giorno stesso del ricevimento dei campioni, cinque il giorno dopo e tre laboratori due giorni dopo; tutti i laboratori partecipanti hanno iniziato la prova nei tempi previsti dal protocollo.

11.3 Monitoraggio della temperatura

La temperatura di conservazione dei campioni durante la spedizione è stata monitorata con mini data logger e non è stata rilevata alcuna criticità.

12. Discussione e conclusione

L'utilizzo delle matrici "tamponi" per la ricerca di *Tylorella equigenitalis* nell'ambito del circuito MD, rappresenta, a nostro avviso, un miglioramento qualitativo importante, perché lo rende maggiormente aderente alle condizioni reali. Tuttavia la gestione dei tamponi e la scelta di proporre, come componente batterica contaminante, anche selezioni di flora microbica prepuziale, pongono oggettive problematiche sia per il laboratorio organizzatore, sia per i laboratori partecipanti.

Il primo deve garantire la preparazione dei campioni prova lo stesso giorno della spedizione; deve assicurarsi che la temperatura di refrigerazione non subisca drastiche variazioni durante il trasporto e verificare la vitalità e stabilità delle componenti microbiche, monitorando la situazione mediante l'esecuzione quotidiana di esami batteriologici eseguiti dal momento della

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

preparazione/distribuzione a quello previsto per l'inizio della prova presso i singoli laboratori. Per una maggiore garanzia i controlli sui campioni prova sono stati protratti fino a 96 ore dal momento della preparazione per garantire le caratteristiche del materiale inviato anche in caso di ritardi nella consegna da parte del corriere.

I laboratori partecipanti, da parte loro, sono stati invitati a iniziare la prova entro le 48 ore dal prelievo/spedizione, che per i laboratori più lontani spesso ha significato un'organizzazione particolare per garantire l'inizio prove il giorno stesso dell'arrivo ed entro le 48 ore.

In generale le performance dei laboratori risultano buone, nonostante il circuito e la natura dei campioni prova siano particolarmente complessi e impegnativi.

Le difficoltà maggiori si sono osservate con i campioni prova contenenti flora microbica prepuziale di equino, nella quale si possono trovare specie batteriche saprofiti dalle caratteristiche morfocolturali simili a *Taylorella equigenitalis*.

Si è inoltre utilizzato in aggiunta ai ceppi di riferimento anche un ceppo di *Taylorella equigenitalis* di campo per dar modo ai laboratori partecipanti di confrontarne le caratteristiche e le peculiarità colturali: Si è osservato, in generale, che i ceppi di *Taylorella equigenitalis* isolati dagli animali presentano una crescita più lenta, una maggiore sensibilità alle condizioni di incubazione (temperatura, concentrazione di CO₂, ecc.) e alle caratteristiche dei terreni di isolamento, rispetto ai ceppi di controllo, ben adattati alle condizioni di crescita *in vitro*.

Note

1. I laboratori sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric (Informativa ex art. 13 del D.Lgs. n. 196/30.6.2003 e s.m. e i. "Codice in materia di protezione dei dati personali"):

- i dati acquisiti sono utilizzati dall'Istituto per il Circuito Interlaboratorio AQUA e la gestione delle attività correlate;
- le attività comportanti il trattamento dei dati conferiti sono svolte per conseguire finalità a carattere istituzionale;
- il trattamento dei dati è effettuato sia con strumenti informatici che cartacei da parte dei servizi dell'Istituto;
- il titolare del trattamento è l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie in persona del Direttore Generale con sede in Legnaro (PD) – Viale dell'Università, 10 e il Responsabile della Struttura Complessa SCT3 è il dr Vicenzoni Gaddo Francesco;
- l'interessato potrà esercitare i diritti di cui all'art. 7 del D.Lgs. n. 196/2003 rivolgendosi all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie con sede in Legnaro (PD) – Viale dell'Università, 10).

2. Tutti gli operatori dell'Organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA MD 1-2015 sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

Data report 24/12/2015

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

Dr.ssa Michela Corrà

☎ (+39) 0498084294

Fax (+39) 0498830277

✉ e-mail: mcorro@izsvenezie.it