

Risultati Circuito MD3 2015

Schema Microbiologia Diagnostica

Circuito Interlaboratorio AQUA Schema Microbiologia Diagnostica

Esame microbiologico:
isolamento e identificazione

ANNO 2015

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Indice

1. Introduzione.....	4
2. Bibliografia.....	4
3. Composizione dei campioni prova.....	5
4. Indicazioni generali.....	5
4.1 Allestimento dei campioni prova.....	5
4.2 Raccomandazioni.....	5
4.3 Gestione dei campioni prova.....	6
4.4 Esecuzione dell'analisi.....	6
5. Determinazioni e valori assegnati.....	6
6. Interpretazione dei risultati.....	6
7. Termini e abbreviazioni.....	7
8. Laboratori partecipanti.....	7
9. Risultati.....	7
9.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante.....	7
9.2 Elaborazioni statistiche.....	8
9.3 Risultati in dettaglio per laboratorio.....	9
9.3.1 Identificazione di genere.....	9
9.3.2 Identificazione di specie.....	10
9.4 K complessivo.....	11
9.4.1 K complessivo per genere.....	11
9.4.2 K complessivo per specie.....	12
10. Altre elaborazioni.....	12
10.1 Temperature di trasporto.....	12
10.2 Tempistiche inizio/fine prova.....	12
10.3 Tipologia di analisi.....	13
11. Discussione.....	13
11.1 Criticità rilevate dai laboratori partecipanti.....	13
11.2 Criticità rilevate dal laboratorio organizzatore.....	13
12. Conclusioni.....	14
Note.....	14

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

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

1. Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, MD3- Esame microbiologico: isolamento e identificazione, organizzato dal Laboratorio Diagnostica Clinica – Struttura Complessa Territoriale 3, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ha come obiettivo il confronto delle metodiche analitiche e lo scambio d'informazioni tecnico-scientifiche tra laboratori. Si propone inoltre di garantire l'assicurazione qualità dei risultati e la valutazione delle performance dei laboratori.

Possono partecipare al circuito i laboratori territoriali dell'IZSVE e i laboratori di altri Istituti pubblici e privati; i primi per l'esecuzione delle prove applicano le procedure in uso presso l'IZSVE; gli altri applicano le procedure di prova in uso presso le rispettive strutture.

Per l'anno 2015 è stata allestita una prova pilota che ha coinvolto i soli laboratori dell'IZSVE.

La distribuzione MD3-2015 ha compreso 3 campioni prova preparati utilizzando la matrice tampone con terreno di trasporto a simulare i campioni diagnostici inviati di routine ai Laboratori Territoriali IZSVE da sottoporre a esame batteriologico.

Per la preparazione delle colture batteriche si sono utilizzati ceppi batterici di riferimento (ATCC, NCTC) e/o isolati di campo identificati nel corso dell'attività diagnostica.

Per ogni lotto di campioni-prova prodotto, sono state eseguite prove di omogeneità e di stabilità. Tali prove sono state eseguite su tutti i lotti scelti per la distribuzione e ripetute il giorno della spedizione e per i quattro giorni successivi ai fini di garantire l'omogeneità e la stabilità dei campioni prova.

I campioni prova, opportunamente identificati, sono stati inviati a temperatura controllata (+ 2-+8°C), monitorata mediante micro data logger inseriti nella confezione e rispettando le condizioni previste dalla normativa vigente sul trasporto di materiale biologico.

I documenti di carattere generale del circuito AQUA (organizzazione, scheda di sicurezza) e i documenti specifici dello schema Microbiologia Diagnostica - MD (protocollo con modalità operative, modalità per l'inserimento dei risultati, report) sono disponibili sul sito web dell'IZSVE (www.izsvenezie.it).

La valutazione dei risultati, inseriti dai laboratori partecipanti, è stata effettuata utilizzando la statistica K di Cohen (K) che permette di valutare il grado di concordanza tra risultati attesi e risultati del singolo laboratorio. E' 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., *et al.* (1994) "Clinical Veterinary Microbiology". Wolfe Ed., 178-179.
- Hogan, J.S., 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

- Mancin,M., Barco,L., Saccardin,C., Ricci,A. Proposed statistical analysis to evaluate qualitative proficiency testing of Salmonella serotyping. Accreditation and Quality Assurance, 2015, 1-6, Springer Berlin Heidelberg
- Markey B. et al. - Clinical Veterinary Microbiology, Mosby Elsevier, II Ed.2013, 335-343
- Sidney Siegel, *et al.* (1992) “Statistica non parametrica”. McGraw-Hill Companies
- 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

Matrice	Organo/ apparato	specie	Segni clinici/ anatomopatologici	Composizione
Tampone 1	condotto uditivo	cane	scuotimento frequente della testa	<i>Streptococcus canis</i> ceppo di campo rif.15DIA-PD/2958/2, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Tampone 2	utero	cavallo	ipofertilità	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> ceppo di campo rif.15DIA-PD/2698, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Tampone 3	polmone	bovino	polmonite apicale con essudazione fibrinosa	<i>Pasteurella multocida</i> ceppo di campo rif. 15DIA-PD/2697, <i>Aerococcus viridans</i> ceppo di campo rif.15DIA-PD/2700

4. Indicazioni generali

4.1 Allestimento dei campioni prova

1. Preparazione delle sospensioni batteriche con ceppo singolo o miste
2. Valutazione della crescita in piastra dei diversi ceppi e selezione delle combinazioni batteriche.
3. Allestimento della matrice “tampone” con terreno di trasporto e conservazione a +2-+8°C.
4. Verifica della vitalità e della stabilità della componente microbica nella matrice tampone, con prove di crescita effettuate al momento della preparazione dei campioni prova, il giorno della spedizione e per i quattro giorni successivi.

4.2 Raccomandazioni

Nella confezione è contenuto un micro data logger per il monitoraggio della temperatura durante il trasporto, da rispedire **IMMEDIATAMENTE** al laboratorio organizzatore.

Fino al momento dell'utilizzo, i campioni prova devono essere conservati refrigerati.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Il laboratorio ricevente dovrà segnalare tempestivamente al seguente indirizzo di posta elettronica aqua-md@izsvenezie.it, eventuali problemi riscontrati all'arrivo e all'apertura delle confezioni o il mancato recapito del materiale entro tre giorni lavorativi dalla data di spedizione comunicata.

Indicazioni ulteriori per la manipolazione dei campioni prova sono contenute nella scheda di sicurezza del circuito AQUA, disponibile nei siti AQUAWEB e IZSVE.

4.3 Gestione dei campioni prova

I campioni prova devono essere gestiti come avviene di routine per i campioni diagnostici inviati per esame batteriologico.

4.4 Esecuzione dell'analisi

Procedere con la semina dei campioni sui terreni impiegati di routine per l'esame batteriologico: la scelta dei terreni e delle modalità di incubazione dovrà tenere conto delle note anamnestiche che accompagnano ogni campione.

Eeguire lettura delle piastre e identificazione dei microrganismi seguendo le procedure in uso presso il laboratorio.

5. Determinazioni e valori assegnati

Determinazione	Valore assegnato	Genere e specie
Esame microbiologico: isolamento e identificazione	Positivo	Identificazione microbica
Esame microbiologico: isolamento e identificazione	Negativo/sterile	//

6. Interpretazione dei risultati

L'analisi dei campioni prova fornisce una risposta di tipo qualitativo: “**Positivo**”, nel caso sia evidenziata la presenza di crescita microbica, in questo caso si procede con l'identificazione delle specie presenti; “**Negativo**”, nel caso in cui non sia evidenziata crescita microbica.

I risultati inseriti dai laboratori partecipanti sono stati elaborati statisticamente utilizzando la statistica K di Cohen, che fornisce una misura dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte qualitative fornite dai laboratori e il risultato atteso.

7. Termini e abbreviazioni

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

8. Laboratori partecipanti

Hanno partecipato al circuito pilota AQUA MD2- 2015 Diagnosi Infezioni Intramammarie sette Laboratori Territoriali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

9. Risultati

9.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante

matrice/ laboratori	Tampone 1 condotto uditivo cane	Tampone 2 utero di cavallo	Tampone 3 polmone bovino
Risultato atteso	<i>Streptococcus canis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Aerococcus viridans</i>
L000332	<i>Streptococcus</i> gruppo G – <i>St. canis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Streptococcus equi. subsp</i> <i>zooepidemicus</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Streptococcus spp.</i> gruppo D
L000342	<i>Streptococcus canis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Enterococcus spp.</i>
L000348	<i>Streptococcus canis</i> <i>Pseudomonas spp</i>	<i>Streptococcus equii spp</i> <i>zooepidemicus</i> <i>E. coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Enterococcus</i>
L000352	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Streptococcus. spp</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella spp.</i> <i>Enterococcus spp.</i>
L000383	<i>Streptococcus canis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus equi spp</i> <i>zooepidemicus</i> <i>Escherichia coli emolitico</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Aerococcus viridans</i>
L000392	<i>Streptococcus canis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> <i>Escherichia coli emolitico</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Stafilococcus spp</i> <i>coagulasi negativo</i>
L000441	<i>Streptococcus canis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus equi ssp</i> <i>zooepidemicus</i> <i>Escherichia coli emolitico</i>	<i>Pasteurella multocida</i> <i>Aerococcus viridans</i>

Note: in giallo sono evidenziate le identificazioni di genere e/o di specie non concordi con i risultati attesi e in grigio le identificazioni limitate al solo genere.

9.2 Elaborazioni statistiche

L'analisi dei campioni del circuito fornisce una tipologia di risposta categoriale che prevede la denominazione dei campioni inviati. E' importante conoscere la validità di un test, cioè la corretta identificazione dei microorganismi contenuti nei campioni. Il Kappa di Cohen è una misura dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte categoriali di un laboratorio e del laboratorio di riferimento detto "gold" standard.

L'indice *K* di concordanza può assumere valori compresi tra -1 (massimo disaccordo) e +1 (massimo accordo). Se l'accordo osservato è uguale all'accordo atteso per effetto del caso, *K* assume un valore uguale a 0 (accordo nullo). Ad ogni valore di *K* è associata la significatività (p-value) che indica se l'accordo osservato è reale o semplicemente dovuto al caso.

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

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

La valutazione della concordanza è stata fatta sia considerando la risposta in termini di genere del microorganismo, sia di specie.

Si riporta di seguito il calcolo della statistica *K* di Cohen per valutare la concordanza tra esito atteso e risultato del partecipante, calcolato rispettivamente per genere e specie batterica. Si riportano inoltre i valori di *K* di Cohen complessivi che valutano la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti nella risposta data sempre in termini di identificazione di genere e di specie batterica.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

9.3 Risultati in dettaglio per laboratorio

9.3.1. Identificazione di genere

. kap atteso L000332

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
66.67%	11.11%	0.6250	0.1350	4.63	0.0000

. kap atteso L000342

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
83.33%	13.89%	0.8065	0.1586	5.09	0.0000

. kap atteso L000348

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
83.33%	13.89%	0.8065	0.1586	5.09	0.0000

. kap atteso L000352

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
66.67%	11.11%	0.6250	0.1350	4.63	0.0000

. kap atteso L000383

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	16.67%	1.0000	0.1826	5.48	0.0000

. kap atteso L000392

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
83.33%	13.89%	0.8065	0.1586	5.09	0.0000

. kap atteso L000441

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	16.67%	1.0000	0.1826	5.48	0.0000

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

9.3.2. Identificazione di specie

. kap atteso L000332

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
66.67%	11.11%	0.6250	0.1350	4.63	0.0000

. kap atteso L000342

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
83.33%	13.89%	0.8065	0.1586	5.09	0.0000

. kap atteso L000348

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
66.67%	11.11%	0.6250	0.1350	4.63	0.0000

. kap atteso L000352

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
16.67%	2.78%	0.1429	0.0583	2.45	0.0072

. kap atteso L000383

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	16.67%	1.0000	0.1826	5.48	0.0000

. kap atteso L000392

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
83.33%	13.89%	0.8065	0.1586	5.09	0.0000

. kap atteso L000441

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	16.67%	1.0000	0.1826	5.48	0.0000

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

9.4 K complessivo

9.4.1 K complessivo per genere

	L000332	L000342	L000348	L000352	L000383	L000392	L000441	complessivo
K per genere	0.625	0.8065	0.8065	0.625	1.000	0.807	1.000	0.752
p-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

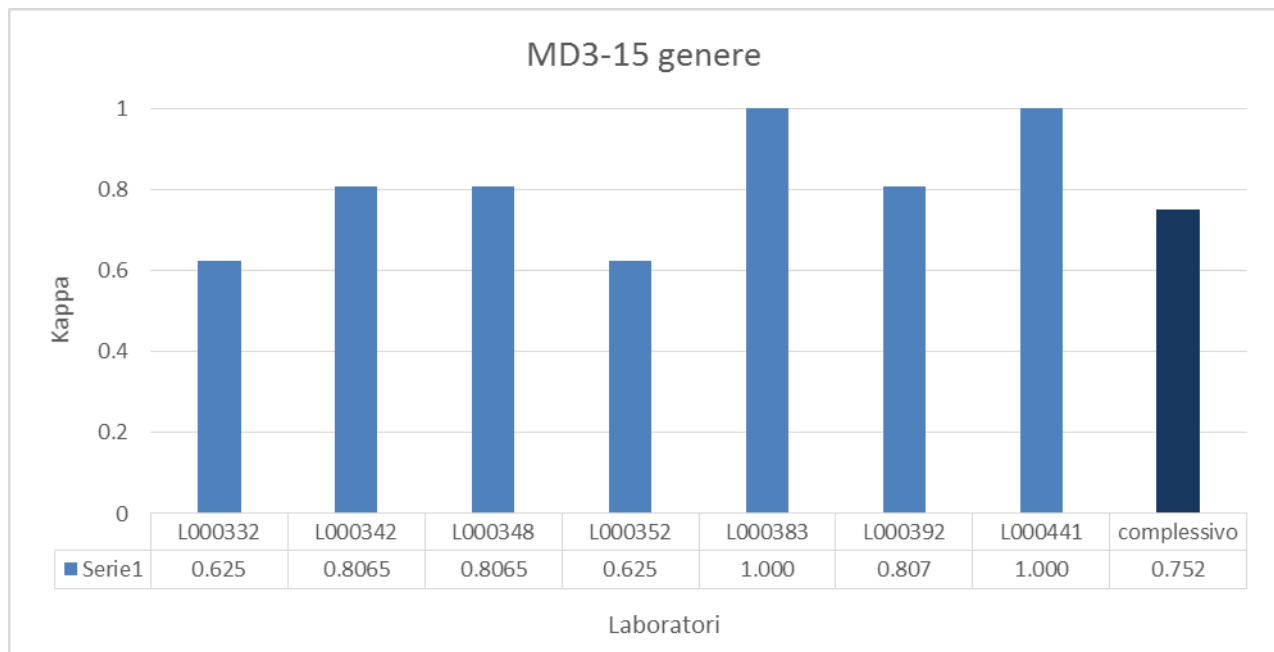


Figura 1: Concordanza nell'identificazione del genere batterico tra esito atteso e risultato del laboratorio partecipante (K singoli laboratori) e tra tutti i laboratori (K complessivo)

9.4.2 K complessivo per specie

	L000332	L000342	L000348	L000352	L000383	L000392	L000441	complessivo
K per specie	0.625	0.8065	0.625	0.1429	1.000	0.807	1.000	0.561
p-value	0.000	0.000	0.000	0.0072	0.000	0.000	0.000	0.000

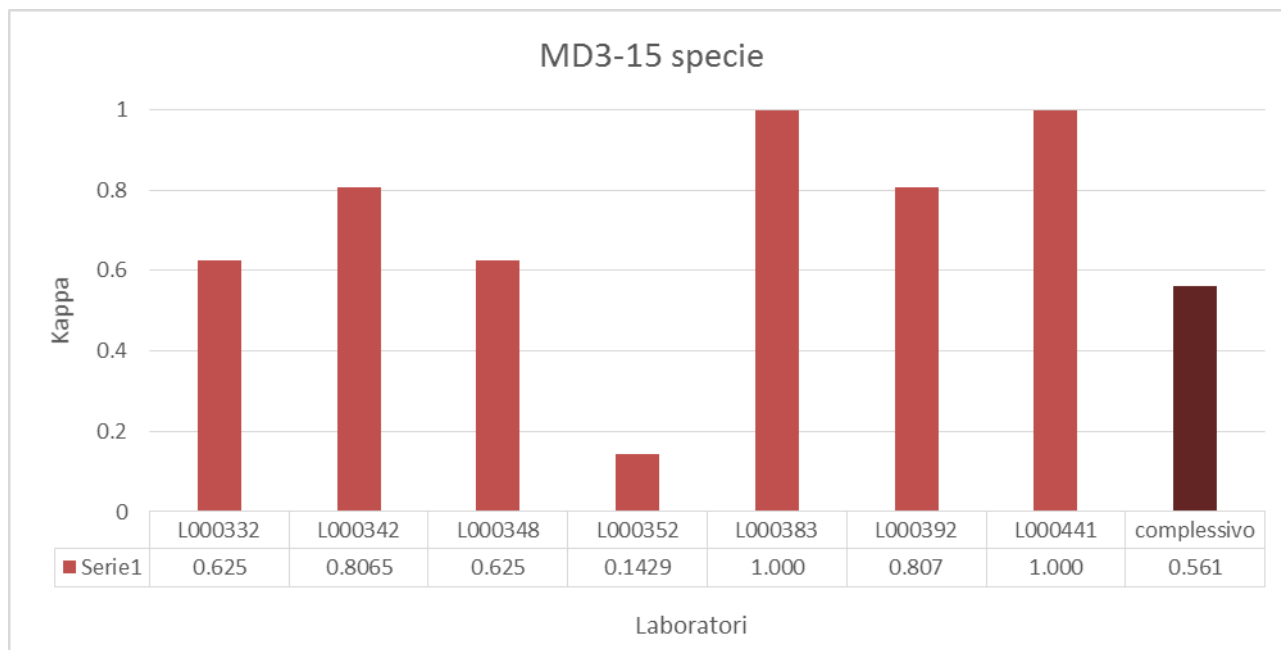


Figura 2: Concordanza nell'identificazione della specie batterica tra esito atteso e risultato del laboratorio partecipante (K singoli laboratori) e tra tutti i laboratori (K complessivo)

10. Altre elaborazioni

10.1 Temperature di trasporto

Dalle misurazioni acquisite con i micro data logger non si sono evidenziate anomalie di temperatura durante il trasporto.

10.2 Tempistiche inizio/fine prova

1. Tutti i partecipanti hanno ricevuto i campioni prova entro il 08/06/2015
2. Quattro laboratori hanno iniziato l'analisi lo stesso giorno del ricevimento; due il giorno successivo e un laboratorio una settimana dopo (15/06/2015).
3. L'intervallo di tempo necessario per l'esecuzione delle prove, ricavato dalla data inizio e fine analisi indicata dai singoli partecipanti, risulta compreso tra 3 e 13 giorni (in particolare: 3 giorni, un laboratorio; 4 giorni, due laboratori; 6 giorni, un laboratorio; 10 giorni due laboratori; 13 giorno, un laboratorio).

10.3 Tipologia di analisi

1. Tutti i partecipanti hanno utilizzato per l'esame batteriologico il terreno nutriente di base (AS 6 laboratori e ASE 1 laboratorio.) incubato in aerobiosi e microaerofilia, abbinato con un terreno selettivo differenziale per enterobatteri (MCC agar 6 laboratori e EMB 1 laboratorio) previsti nella metodica dell'esame batteriologico standard; a questi alcuni laboratori hanno aggiunto, già in primo isolamento, altri terreni selettivo/differenziali diversificati e scelti secondo il simulato.
2. Tutti i laboratori hanno eseguito l'identificazione batterica mediante test biochimici tradizionali quali ad esempio uso di terreni selettivi e/o differenziali, sistema identificazione API, valutazione catalasi, ossidasi, coagulasi, colorazione secondo Gram; kit sierologici di agglutinazione rapida.
Un laboratorio ha dichiarato di aver eseguito solo l'identificazione di genere e non quella di specie per scelte organizzative interne.

11. Discussione

11.1 Criticità segnalate dai laboratori partecipanti

Non si sono ricevute segnalazioni di criticità né in fase di ricevimento campioni, né nel corso dell'esecuzione delle prove.

11.2 Criticità rilevate dal laboratorio organizzatore

- a. Si è rilevato che un laboratorio partecipante ha iniziato le analisi una settimana dopo il ricevimento dei campioni prova. Trattandosi di preparazioni (tamponi con terreno di trasporto) che simulando campioni diagnostici inviati di routine ai Laboratori Territoriali IZSVe, l'eccessivo posticipo dell'inizio delle analisi, potrebbe determinare un'alterazione della componente microbica favorendo le specie batteriche contaminanti/ambientali rispetto a quelle più esigenti
- b. Si è rilevato in molti laboratori l'uso di terreni selettivi/differenziali fin dal primo isolamento, tuttavia tale pratica sembra non aver determinato un'effettiva riduzione dei tempi di risposta.
- c. Si è infine evidenziata una disomogeneità nella denominazione dei microrganismi identificati e in alcuni casi il mancato rispetto delle regole tassonomiche.

12. Conclusioni

Nel complesso il Circuito MD 3 Esame microbiologico: isolamento e identificazione ha ottenuto risultati soddisfacenti dal punto di vista tecnico per l'identificazione di genere, con concordanza buona tra risultati attesi ed effettivi.

L'elaborazione statistica della valutazione dell'accordo tra osservato e atteso in termini di identificazione del genere, ha messo in evidenza un K ottimo per la maggior parte dei laboratori partecipanti ad eccezione di due laboratori che presentano un K buono. Tutti i valori di K 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.

Per quel che riguarda l'identificazione di specie si osserva una disomogeneità sia nell'approccio identificativo, sia nei protocolli di analisi applicati rispetto all'esame batteriologico standard (PDP DIA 63), dovuta prevalentemente a scelte logistiche diverse in funzione della specifica competenza. Ciò si ripercuote in un sensibile prolungamento dei tempi per l'esecuzione delle analisi e in una emissione posticipata dell'eventuale rapporto di prova rispetto ai tempi previsti.

Dal punto di vista statistico, la valutazione dell'accordo tra osservato e atteso in termini di identificazione della specie, ha messo in evidenza per quattro laboratori un K ottimo, per due laboratori un K buono e per un laboratorio un K scarso. Tutti i valori di K sono significativi e quindi non dovuti al caso.

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

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 Nardelli Stefano;
- 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 2-2015 sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

Data report 20/10/2015

*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

----- Fine report -----