

Risultati Circuito MD2 2016

Schema Microbiologia Diagnostica

Circuito Interlaboratorio AQUA
Schema Microbiologia Diagnostica

Diagnosi infezioni intramammarie

ANNO 2016

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.....	6
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.....	9
9.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante.....	9
9.2 Elaborazioni statistiche.....	9
9.3 Risultati in dettaglio per laboratorio.....	10
9.4 K complessivo.....	11
9.5 Sensibilità, specificità e accuratezza.....	13
10. Altre elaborazioni.....	14
10.1 Tempistiche inizio/fine prova.....	14
10.2 Tipologia di analisi.....	14
11. Discussione e conclusioni.....	14
11.1 Criticità segnalate dai laboratorio partecipanti.....	14
11.2 Osservazioni del laboratorio organizzatore.....	14
Appendice: note.....	15

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, MD2- Diagnosi Infezioni Intramammarie, 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 sia laboratori territoriali dell’IZSVe, sia 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 proprie strutture.

La distribuzione MD2-2016 comprendeva 20 campioni prova preparati contaminando aliquote da 3 ml di latte (matrice) con colture mono-specie o miste (due o più ceppi) di batteri tipici dell’ambiente mammario, sia patogeni contagiosi, sia ambientali, e campioni sterili. Per la preparazione delle sospensioni batteriche si sono utilizzati microrganismi 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 il circuito e ripetute il giorno della spedizione e il giorno previsto per l’inizio delle analisi.

I campioni prova, opportunamente identificati, sono stati inviati congelati ($\leq -18^{\circ}\text{C}$), 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 stati messi a disposizione dei laboratori partecipanti su sito AQUAWEB dell’IZSVe (www.izsvenezie.it).

La valutazione dei risultati 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.
- 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

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

- ISO\IEC 17043:2010 “Conformity assessment – General requirements for proficiency testing”

3. Composizione dei campioni prova

MD2 2016 Campioni Prova	
1	Sterile
2	Sterile
3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
4	Sterile
5	<i>Streptococcus uberis</i> rif. 1580/14
6	Sterile
7	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813
8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 + <i>Streptococcus uberis</i> rif. 1580/14
9	Sterile
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
11	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
12	Sterile
13	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813
14	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
15	Sterile
16	Sterile
17	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
18	Sterile
19	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
20	Sterile

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, sia a fresco, sia dopo periodi diversi di congelamento
3. Selezione delle combinazioni batteriche in grado di garantire la presenza nella matrice “latte” di un numero sufficiente di colonie al fine di ovviare eventuali problemi dovuti a cali di titolo e/o competizione microbica.
4. Verifica della sterilità del latte commerciale UHT
5. Allestimento delle sospensioni microbiche in matrice “latte”
6. Verifica della vitalità e della stabilità dei microrganismi nei campioni prova, con prove di crescita effettuate al momento della preparazione e, dopo congelamento, a distanza di 7, 15 e 30 giorni.

4.2 Raccomandazioni

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

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

Prima di iniziare l'analisi portare i campioni prova a temperatura ambiente (18-25°C). I campioni congelati possono essere scongelati mediante immersione in bagno termostatico o posizionamento in camera climatica a temperatura non superiore a 40°C ± 2° fino allo scongelamento.

Tempi e modalità di scongelamento vanno riportati nel campo note “altro” dell'apposita pagina AQUAWEB per l'inserimento dei risultati

4.4 Esecuzione dell'analisi

Inoculare i campioni sui terreni impiegati di routine per l'esame batteriologico del latte (esempio Agar Sangue Esculina), utilizzando anse da 10 µl. Eseguire incubazione, lettura delle piastre e identificazione dei microrganismi seguendo le procedure in uso presso il laboratorio.

5. Determinazioni e valori assegnati

Determinazione	Valore assegnato	Genere specie
Diagnosi infezioni intramammarie	Positivo	Identificazione microbica
Diagnosi infezioni intramammarie	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'isolamento e l'identificazione delle specie microbiche 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	+/-

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. Laboratori partecipanti

Hanno partecipato al circuito AQUA MD2- 2016 Diagnosi Infezioni Intramammarie tredici Laboratori.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica



9. Risultati

9.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante

Identificazione Campione	<i>S. agalactiae</i> Str. gruppo "B"	<i>S. uberis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i> Staph. coag –	<i>Escherichia coli</i>	Negativo /Sterile
1						X
2						X
3			X			
4						X
5		X				
6						X
7	X					
8		X	X			
9						X
10				X		
11			X			
12						X
13	X					
14					X	
15						X
16						X
17				X	X	
18						X
19				X	X	
20						X

9.2 Elaborazioni statistiche

L'analisi dei campioni del circuito fornisce una risposta di tipo qualitativo: positivo/negativo e in caso di positività l'identificazione di specie.

E' importante conoscere la validità di un test, cioè la proporzione di campioni positivi e negativi e l'eventuale corretta identificazione di specie e il Kappa di Cohen è una misura dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte qualitative o 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 non significativamente diverso da 0 (accordo nullo).

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Ad ogni valore di K è associata la significatività (p-value) che indica se l'accordo osservato è reale o semplicemente dovuto al caso.

A scopo interpretativo, si suggerisce l'utilizzo della scala di Landis & Koch sopra riportata.

Tre dei venti campioni prova inviati prevedevano l'identificazione di due microrganismi; nella valutazione statistica, la doppia risposta è stata trattata alla stregua di due campioni indipendenti con un microrganismo ognuno.

Inoltre, per quel che riguarda il risultato dell'identificazione microbica, si è considerata non corretta l'errata identificazione di specie, mentre sono state accettate identificazioni di genere e di gruppo, se compatibili con la flora microbica associata all'ambiente mammario (patogeni contagiosi e ambientali).

Si riportano di seguito i dettagli del calcolo della statistica K di Cohen per valutare la concordanza tra risultato atteso e risultato per singolo laboratorio e il K di Cohen complessivo per valutare la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

9.3 Risultati in dettaglio per laboratorio

. kap atteso 1000332

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
93.75%	22.46%	0.9194	0.0869	10.58	0.0000

. kap atteso 1000348

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
93.75%	22.46%	0.9194	0.0869	10.58	0.0000

. kap atteso 1000352

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
93.75%	22.46%	0.9194	0.0869	10.58	0.0000

. kap atteso 1000383

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	21.09%	1.0000	0.0850	11.76	0.0000

. kap atteso 1000389

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
87.50%	17.48%	0.8485	0.0750	11.32	0.0000

. kap atteso 1000390

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

 93.75% 20.70% 0.9212 0.0831 11.09 0.0000

. kap atteso 1000392

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 93.75% 22.46% 0.9194 0.0869 10.58 0.0000

. kap atteso 1000432

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 93.75% 19.53% 0.9223 0.0813 11.34 0.0000

. kap atteso 1000437

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 87.50% 17.77% 0.8480 0.0770 11.01 0.0000

. kap atteso 1000441

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 100.00% 21.09% 1.0000 0.0850 11.76 0.0000

. kap atteso 1000455

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 100.00% 21.09% 1.0000 0.0850 11.76 0.0000

. kap atteso 1000538

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 90.63% 18.26% 0.8853 0.0776 11.41 0.0000

. kap atteso 1000662

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

 78.13% 16.60% 0.7377 0.0722 10.22 0.0000

9.4 Kappa complessivo

. kap 1000332 1000348 1000352 1000383 1000389 1000390 1000392 1000432 1000437
 1000441 1000455 1000538 1000662

There are 13 raters per subject:

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Outcome	Kappa	Z	Prob>Z
0	0.8359	41.76	0.0000
1	1.0000	49.96	0.0000
2	0.9206	45.99	0.0000
3	0.7725	38.59	0.0000
4	1.0000	49.96	0.0000
5	0.8723	43.58	0.0000
6	0.0216	1.08	0.1406
7	-0.0048	-0.24	0.5954
8	-0.0048	-0.24	0.5954
9	-0.0048	-0.24	0.5954
10	-0.0097	-0.49	0.6862
11	-0.0024	-0.12	0.5479
12	-0.0024	-0.12	0.5479
99	0.8763	43.78	0.0000
combined	0.8396	92.24	0.0000

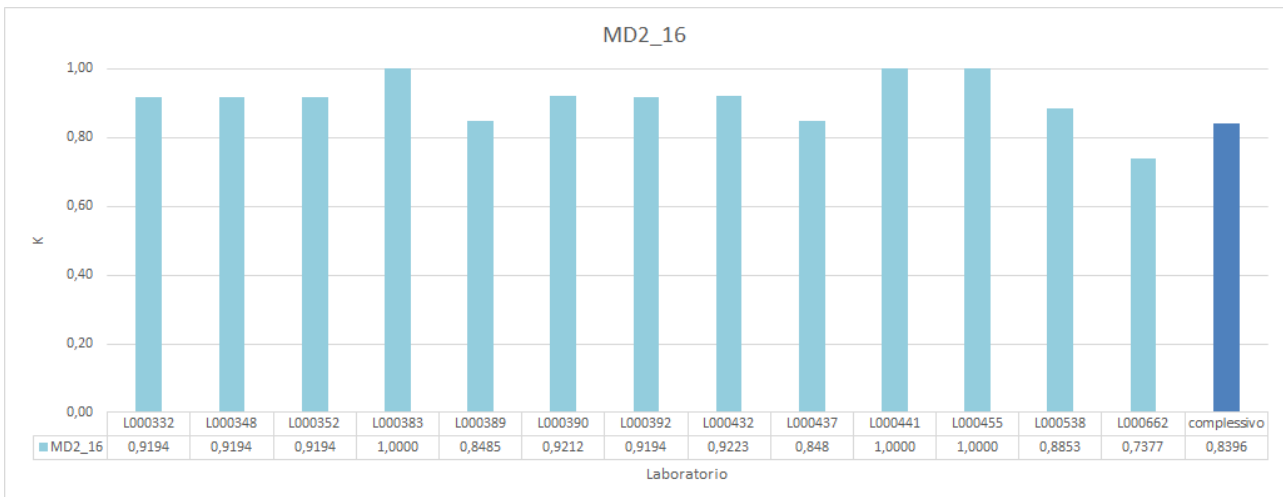


Figura 1: concordanza (K singoli laboratori) tra esito atteso e risultato per singolo laboratorio partecipante e tra tutti i laboratori (K complessivo)

Riassumendo: tutti i laboratori mostrano un'ottima concordanza con l'esito atteso ad eccezione di un laboratorio (L000662), che presenta una buona concordanza.

Tutti i valori di K calcolati sono significativi e quindi la concordanza non è dovuta al caso.

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

9.5 Sensibilità, specificità e accuratezza

Caratteristiche del circuito MD2-2016

valore rilevato	Valore assegnato	
	presente	assente
presente	158	9
assente	11	121
subtotale	169	130
totale	299	

Specificità	93.07% IC ₉₅ [87.26; 96.78]
Sensibilità	93.49% IC ₉₅ [88.65; 96.71]
Accuratezza	93.31% IC ₉₅ [89.86; 95.87]

Figura 2: calcolo sensibilità, specificità e accuratezza

Sensibilità: è la probabilità che un campione positivo sia correttamente identificato

La sensibilità nella tabella è data da: **158/169** dove **158** sono i campioni positivi correttamente identificati, **11** sono campioni positivi non correttamente identificati dai laboratori partecipanti e **169** i campioni effettivamente positivi distribuiti per il circuito interlaboratorio.

Specificità: è la probabilità che un campione negativo sia correttamente identificato.

La specificità nella tabella è data da: **121/130** dove **121** sono i campioni negativi correttamente identificati, **9** sono i campioni negativi riportati come positivi e **130** i campioni effettivamente negativi distribuiti per il circuito interlaboratorio.

Accuratezza (= percentuale di corretta classificazione): è il grado di corrispondenza tra il dato atteso e quello effettivamente riscontrato.

L'accuratezza nella tabella è data da: **279/299**: dove (158+121) sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati riportati dai laboratori partecipanti e **299** sono i campioni **totali** distribuiti.

In totale sono stati esaminati n° 299 campioni prova di cui 169 positivi e 130 negativi.

La sensibilità e la specificità del circuito sono state rispettivamente del 93,49% e del 93,07%; l'accuratezza del 93,31%.

10. Altre elaborazioni

10.1 Tempistiche inizio/fine prova

1. Tutti i partecipanti hanno ricevuto i campioni prova entro 48 ore dalla spedizione (sette il giorno stesso della spedizione, tre entro 24 ore e tre entro 48 ore)
2. La maggior parte dei laboratori ha avviato l'analisi entro 48 ore dalla spedizione; due laboratori hanno ricevuto i campioni il giorno 9 e iniziato al prova il giorno 13.
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 2 e 14 giorni.

10.2 Tipologia di analisi

Tutti i laboratori hanno dichiarato l'utilizzo di metodi interni; questi sono stati valutati sulla base della ISO/IEC 17043:2010 (p. 4.5), per stabilire la loro equivalenza tecnica.

Molti laboratori hanno dichiarato l'utilizzo di un solo terreno di primo isolamento (agar sangue esculina incubato a 37 °C in condizioni di aerobiosi), altri hanno utilizzato più terreni tra cui agar sangue, Mac Conkey agar, Baird Parker agar e terreni specifici per l'isolamento di alcuni microrganismi ad esempio *Prototheca* sp., *Mycoplasma* sp. e lieviti..

Tutti i laboratori hanno eseguito l'identificazione batterica mediante test biochimici tradizionali in macrometodo: valutazione catalasi, ossidasi, coagulasi, colorazione secondo Gram; identificazione tramite sierogruppo per *Streptococcus* sp.; uso di terreni selettivi e/o differenziali e sistemi di identificazione commerciali tipo API e Vitek.; un laboratorio ha dichiarato l'utilizzo di MALDI-TOF per l'identificazione batterica.

11. Discussione e conclusioni

11.1 Criticità segnalate dai laboratori partecipanti

Un laboratorio ha chiesto chiarimenti riguardanti l'identificazione dei campioni prova, in quanto, a causa di un problema tecnico, la stampa delle etichette non era completamente leggibile e gli operatori del laboratorio organizzatore sono intervenuti completando a mano il codice identificativo.

11.2 Osservazioni del Laboratorio organizzatore

Alcuni laboratori hanno identificato specie batteriche diverse da quelle presenti nei campioni prova, isolate anche da campioni sterili. Le specie microbiche identificate risultavano comunque diverse tra loro e diverse nei laboratori coinvolti: *Streptococcus viridans* (parasanguinis), *Bacillus cereus*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus viridans* (salivarius), ecc.. Tale situazione fa pensare a problemi di contaminazione ambientale durante le fasi di manipolazione dei campioni; semina, incubazione delle piastre, passaggi batteriologici e lettura delle colture batteriche. E' possibile che tali inquinamenti siano riconducibili in alcuni casi al prolungamento dei tempi di incubazione e/o alla semina su più terreni di coltura, contemporaneamente o in successione.

Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

Si segnala inoltre, per alcuni laboratori, la non corretta trascrizione di genere e specie secondo quanto previsto dalla tassonomia batteriologica.

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

- 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 01/09//2016

*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 -----