

Aqua

Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati

Circuito di microbiologia diagnostica
Report schema AQUA MD 2-23

Circuito Interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica

Schema AQUA MD2-23

Diagnosi infezioni intramammarie

ANNO 2023

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

Sommario

1	Introduzione.....	3
2	Bibliografia.....	4
3	Composizione dei campioni prova	4
	Indicazioni generali	5
3.1	Allestimento dei campioni prova	5
3.2	Raccomandazioni	5
3.3	Gestione dei campioni prova.....	5
3.4	Esecuzione dell'analisi.....	5
4	Determinazioni e valori assegnati	6
5	Interpretazione dei risultati.....	6
6	Termini e abbreviazioni.....	6
7	Laboratori partecipanti	7
8	Risultati	8
8.1	Risultati attesi.....	8
8.2	Elaborazioni statistiche	9
8.3	Kappa dei singoli laboratori e complessivo	9
8.4	Sensibilità, specificità ed esattezza	11
9	Altre elaborazioni	13
9.1	Tempi d'inizio/fine prova.....	13
9.2	Tipologia di analisi.....	14
10	Discussione e conclusioni.....	15
10.1	Criticità segnalate dai laboratori partecipanti.....	15
10.2	Considerazioni del laboratorio organizzatore.....	15

1 Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, Schema AQUA 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 di contribuire alla valutazione delle performance di laboratorio.

Partecipano 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 rispettive strutture.

Per lo schema MD2-2023 sono stati preparati venti campioni prova contaminando altrettante aliquote da 5 ml di latte con colture mono - e multi-specie di microrganismi tipici dell'ambiente mammario (patogeni contagiosi, ambientali) e campioni sterili.

Per le sospensioni batteriche sono stati impiegati microrganismi di riferimento (ATCC, NCTC) e/o isolati di campo identificati nel corso dell'attività diagnostica.

Ogni lotto di campioni-prova prodotto è stato sottoposto a prove di omogeneità e di stabilità. Tali prove sono state ripetute il giorno della spedizione, il giorno previsto per l'inizio delle analisi e dopo una settimana dalla spedizione.

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 di Microbiologia Diagnostica (organizzazione, scheda di sicurezza) e i documenti specifici dello schema – AQUA MD2 Diagnosi infezione intramammarie (protocollo con modalità operative, modalità per l'inserimento dei risultati, report) sono consultabili sul sito AQUAWEB dell'IZSVe (www.izsvenezie.it).

La valutazione dei risultati è stata fatta utilizzando la statistica K di Cohen (K) che permette di valutare il grado di concordanza tra risultati attesi e risultati dei singoli laboratori. E' stato inoltre calcolato il 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.
- 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.
- Sidney Siegel, *et al.* (1992) "Statistica non parametrica". McGraw-Hill Companies.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2018 "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

1	Sterile
2	<i>Corynebacterium mastitidis</i> rif. 20DIA-PD/765, <i>Proteus mirabilis</i> rif. 19DIA-PD/338
3	Sterile
4	<i>Candida rugosa</i> rif. 19DIA-PD/684
5	Sterile
6	Sterile
7	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
8	<i>Streptococcus uberis</i> rif. 20DIA-PD/1010, <i>Streptococcus agalactiae</i> rif. 19DIA-PD/1010
9	Sterile
10	Sterile
11	<i>Streptococcus agalactiae</i> rif. 21DIA-PD/1703, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
12	Sterile
13	<i>Prototheca zopfii</i> genotipo 2 rif. 19DIA-PD/871
14	<i>Streptococcus canis</i> rif. 19DIA-PD/656, <i>Escherichia coli</i> ceppo emolitico rif. 19DIA-PD/3318
15	Sterile
16	<i>Streptococcus agalactiae</i> rif. 19DIA-PD/657, <i>Trueperella pyogenes</i> rif. 18DIA-PD/1416
17	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 21DIA-PD/2335
18	Sterile
19	Campione di campo: <i>Escherichia coli</i> rif. 23DIA-PD/229 (contaminanti: <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> coagulasi negativo)
20	Campione campo: <i>Streptococcus uberis</i> rif. 23DIA-PD/229

Indicazioni generali

3.1 Allestimento dei campioni prova

Per la preparazione dei campioni prova è stato seguito il seguente protocollo:

1. Preparazione delle sospensioni batteriche mono - e multi-specie.
2. Valutazione della crescita in piastra dei diversi microrganismi, 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, utilizzato per la preparazione della matrice.
5. Allestimento delle sospensioni microbiche in matrice "latte".
6. Verifica dell'omogeneità e della stabilità dei campioni prova.

3.2 Raccomandazioni

Ai laboratori partecipanti è stato chiesto di conservare i campioni prova congelati fino al momento dell'utilizzo e di segnalare tempestivamente al laboratorio organizzatore eventuali problemi riscontrati all'arrivo e all'apertura delle confezioni o il mancato recapito del materiale entro tre giorni dalla data di spedizione.

3.3 Gestione dei campioni prova

Prima dell'esecuzione delle analisi, i campioni prova devono essere portati a temperatura ambiente (18-25 °C) mediante immersione in bagno termostatico, oppure mediante incubazione in camera climatica a temperatura non superiore a 40 °C \pm 2 °C fino allo scongelamento.

Tempi e modalità di scongelamento adottati vanno indicati nel campo note "altro" della pagina AQUAWEB per l'inserimento dei risultati.

3.4 Esecuzione dell'analisi

Per l'esecuzione delle analisi ogni laboratorio utilizza le rispettive procedure di prova, tuttavia è consigliato l'impiego di terreni nutritivi con sangue per la valutazione dell'emolisi (ad esempio Agar Sangue, Agar Sangue Esculina) e la semina con anse da 10 μ l.

4 Determinazioni e valori assegnati

Determinazione	Valore assegnato	Genere specie
Diagnosi infezioni intramammarie	Positivo	Identificazione microbica
Diagnosi infezioni intramammarie	Negativo/sterile	//

5 Interpretazione dei risultati

L'analisi dei campioni prova fornisce una risposta di tipo qualitativo: "**Positivo**", nel caso sia evidenziata crescita microbica, in questo caso si procede con l'isolamento e l'identificazione dei microrganismi; "**Negativo**", in caso di assenza di crescita microbica.

I risultati inseriti dai laboratori partecipanti sono valutati applicando 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.

6 Termini e abbreviazioni

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

Per l'interpretazione dei valori di K, 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

7 Laboratori partecipanti

Hanno partecipato allo schema AQUA MD2-2023 Diagnosi infezioni intramammarie **diciassette** laboratori.



Figura 1: laboratori partecipanti

8 Risultati

8.1 Risultati attesi

Identificazione Campione	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Prothoteca zopfii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Corynebacterium mastitidis</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Streptococcus canis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Negativo /Sterile
1												X
2					X	X						
3												X
4							X					
5												X
6												X
7			X									
8	X	X										
9												X
10												X
11	X		X									
12												X
13				X								
14								X	X			
15												X
16	X									X		
17											X	
18												X
19									X			
20		X										

8.2 Elaborazioni statistiche

Lo schema prevede delle risposte di tipo qualitativo: positivo/negativo, in caso di positività è richiesta l'identificazione batterica.

I risultati delle analisi forniti dai laboratori partecipanti sono valutati con la statistica K di Cohen, che fornisce 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).

A 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 di K, si utilizza la scala di Landis & Koch.

Nel caso particolare dello schema AQUA MD2-2023, sono stati distribuiti **venti** campioni prova: 18 campioni simulati e due campioni mastitici di campo; cinque campioni prova sono stati inoculati con due specie microbiche. Nella valutazione statistica effettuata, le due specie batteriche sono state considerate come due campioni indipendenti, pertanto l'analisi statistica dei risultati è stata condotta su **venticinque** determinazioni (di seguito denominate **campioni**) di tipo qualitativo.

I contaminanti presenti nei due campioni mastitici di campo (campione prova n.19 e n.20) non sono stati considerati ai fini dell'elaborazione dati.

Per quel che riguarda la valutazione dei risultati, si è ritenuto di considerare "**conforme**" per uno stesso microrganismo eventuali identificazioni di genere e di "gruppo": *Streptococcus agalactiae*/*Streptococcus* spp. gruppo B; *Enterococcus faecium*/*Enterococcus* spp./*Streptococcus* gruppo D; *Staphylococcus aureus*/*Staphylococcus* spp. coagulasi positivo; *Prototheca zopfii*/*Prototheca* spp.; *Streptococcus dysgalactiae*/*Streptococcus* gruppo C; *Corynebacterium mastitidis*/*Corynebacterium* spp./corineforme/altre specie di *Corynebacterium* spp.; *Trueperella pyogenes*/*Corynebacterium pyogenes*; *Candida rugosa*/*Diatina rugosa*/*Candida* spp./lieviti; *Escherichia coli*/coliformi in quanto tali identificazioni permettono ugualmente di riconoscere e distinguere i microrganismi patogeni contagiosi dagli ambientali associati all'ambiente mammario.

È stata invece considerata non conforme la mancata identificazione di specie per *Streptococcus uberis*, in quanto importante patogeno dell'ambiente mammario.

8.3 Kappa dei singoli laboratori e complessivo

Si riportano di seguito i valori di K e relativi p-value che indicano la concordanza tra risultato atteso e risultato di ogni laboratorio e il valore complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

	L000332	L000336	L000352	L000383	L000389	L000390	L000392	L000432
kappa	0,9174	0,9592	0,9592	1,0000	1,0000	1,0000	0,9174	1,0000
P value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	L000437	L000460	L000480	L000497	L000672	L000690	L000727	L000771
kappa	0,9597	0,7587	0,8366	0,9592	0,7997	0,9592	0,9593	0,9592
P value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	L000888	Complessivo
kappa	0,9593	0,8864
P value	0,0000	0,0000

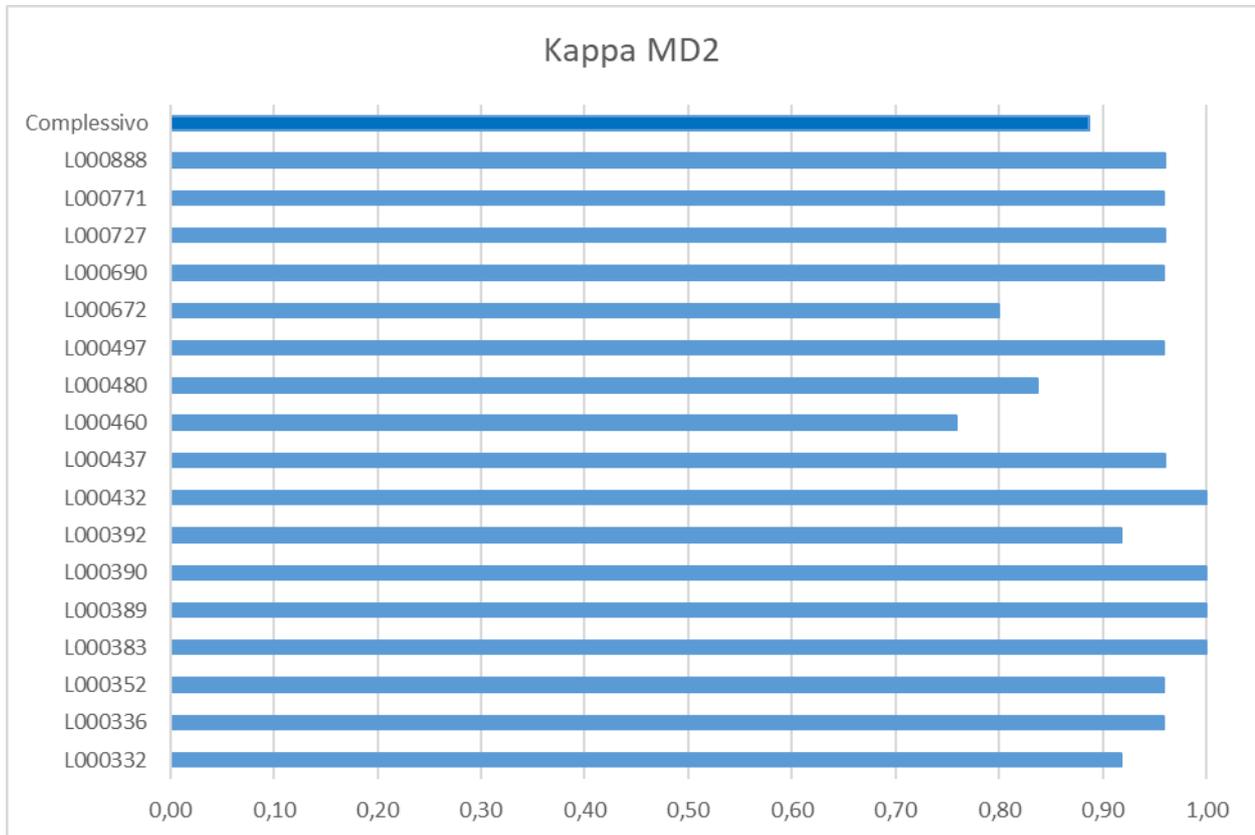


Figura 2: concordanza tra esito atteso e risultato del singolo laboratorio partecipante (K singoli laboratori) e tra tutti i laboratori (K complessivo).

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

In conclusione, l'analisi dei risultati ha mostrato un'ottima concordanza di tutti i laboratori con l'esito atteso, a esclusione dei laboratori L000460 e L000672 la cui concordanza con l'esito atteso è risultata buona.

L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori è ottimo.

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

8.4 Sensibilità, specificità ed esattezza

Caratteristiche dello schema AQUA MD2 Diagnosi infezioni intramammarie

Periodo 2016-2023

valore rilevato	Valore assegnato	
	presente	assente
presente	1669	82
assente	140	1197
subtotale	1809	1279
totale	3088	

Sensibilità	92,26 % IC ₉₅ [90,93; 93,45]
Specificità	93,59 % IC ₉₅ [92,10; 94,87]
Esattezza	92,81 % IC ₉₅ [91,84; 93,70]

Figura 3: sensibilità, specificità ed esattezza calcolata sui risultati forniti dai laboratori partecipanti nel periodo 2016-2023

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

La sensibilità nella tabella è data da: **1669/1809** dove 1669 sono i campioni positivi correttamente identificati, **140** sono campioni positivi non correttamente identificati dai laboratori partecipanti e **1809** è il totale dei campioni esitati come positivi dal 2016 ad oggi.

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

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

La specificità nella tabella è data da: **1197/1279** dove 1197 sono i campioni negativi correttamente identificati, **82** sono i campioni negativi non correttamente identificati e **1279** è il totale dei campioni esitati come negativi dal 2016 ad oggi.

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

L'esattezza nella tabella è data da: **2866/3088**: dove (1669+1197=2866) sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati dai laboratori partecipanti e **3088** è il totale dei campioni esitati dal 2016 ad oggi.

La sensibilità e la specificità del circuito sono state rispettivamente del 92,26% e del 93,59%; l'esattezza del 92,81%.

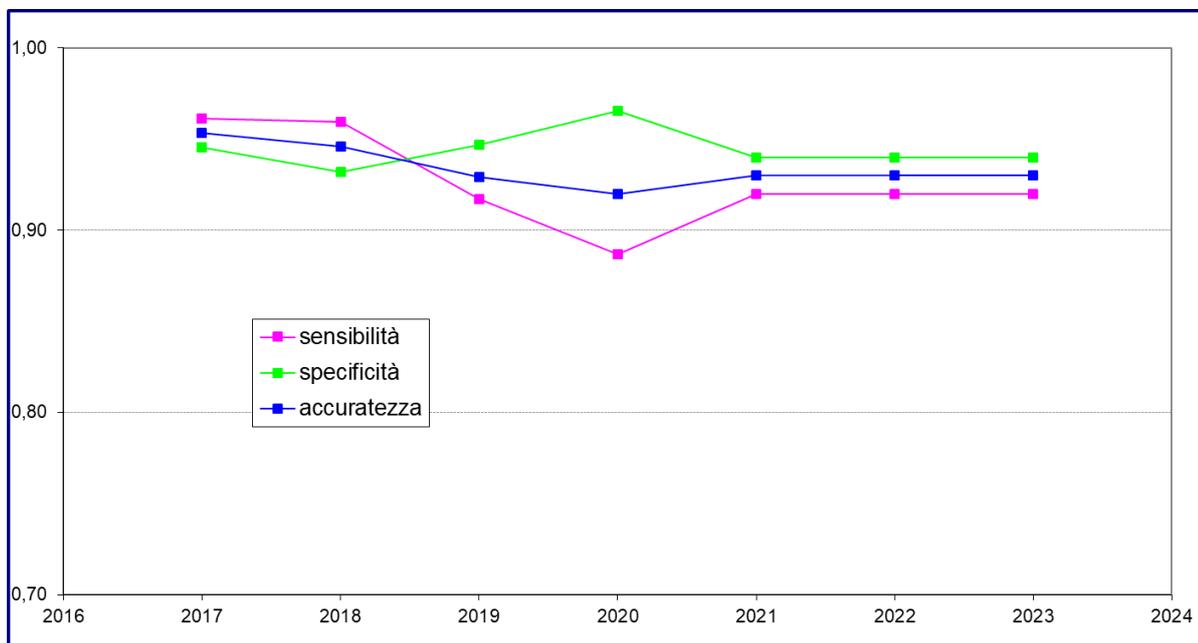


Figura 4: performance dei laboratori partecipanti nel periodo 2016-2023

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

Caratteristiche dello schema AQUA MD3 Diagnosi infezioni intramammarie, riferite all'anno 2023

2023			
Valore rilevato	Valore assegnato		
		presente	assente
	presente	251	12
	assente	21	151
	subtotale	272	163
totale	435		

Sensibilità	92,28%	IC ₉₅ [88,44; 95,16]
Specificità	92,64%	IC ₉₅ [87,49; 96,14]
Esattezza	92,41%	IC ₉₅ [89,51; 94,72]

Figura 5: sensibilità, specificità ed esattezza relative allo schema AQUA MD 2 2023

Nel periodo 2016-2023 sono stati distribuiti in totale n° 2600 campioni prova di cui 1367 positivi e 1233 negativi.

9 Altre elaborazioni

9.1 Tempi d'inizio/fine prova

Tutti i laboratori partecipanti, ad eccezione di due, hanno ricevuto i campioni prova entro 48 ore dalla spedizione: quattro laboratori nella stessa giornata della spedizione, uno entro le 24 ore, dieci entro 48 ore. Due laboratori hanno ricevuto i campioni prova entro le 72 ore.

La maggior parte dei laboratori ha avviato le analisi entro cinque giorni dal ricevimento: cinque il giorno stesso dell'arrivo, uno entro 24 ore, sette entro il quarto e due laboratori entro il quinto giorno. Due laboratori hanno iniziato le analisi dopo 11 giorni.

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

L'intervallo di tempo necessario per l'esecuzione delle prove, ricavato dalla data di inizio e di fine analisi dichiarata dai singoli partecipanti, è compreso tra i 5 e i 16 giorni.

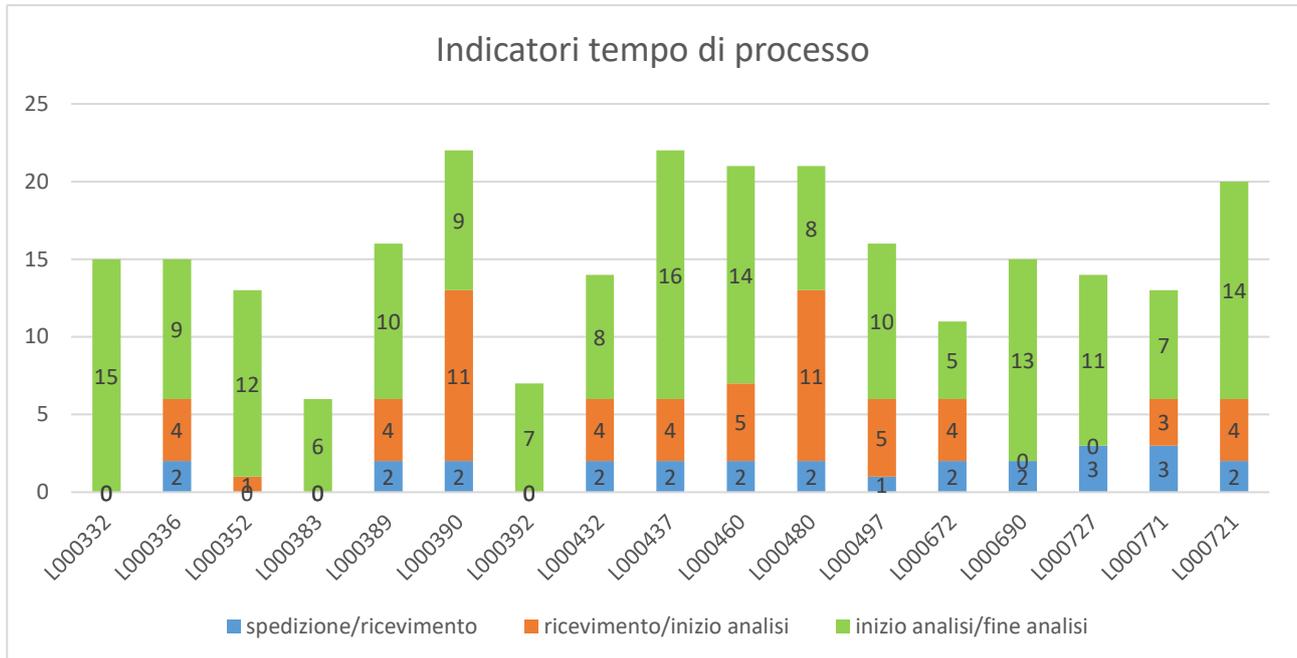


Figura 6: AQUA MD 2-2023: tempistiche ricevimento campioni e inizio/fine prova

9.2 Tipologia di analisi

Tutti i laboratori hanno dichiarato l'utilizzo di metodi interni: 2 laboratori hanno specificato che i metodi utilizzati sono validati; un laboratorio non ha specificato (altro).

I laboratori hanno dichiarato l'utilizzo di terreni nutritivi di primo isolamento: agar sangue con o senza esulina incubato a 37 °C in condizioni di aerobiosi; alcuni laboratori hanno associato altri terreni selettivi/differenziali tra i quali: EMB, Mac Conkey agar, Baird Parker agar, TKT, ALOA medium, terreni per *Mycolasma* spp., e terreni cromogeni specifici per l'isolamento di *Prototheca* spp., lieviti e muffe.

In generale i laboratori hanno eseguito l'identificazione batterica ricorrendo a test biochimici tradizionali in macrometodo: catalasi, ossidasi, coagulasi, colorazione secondo Gram e l'identificazione tramite siero-gruppo per *Streptococcus* spp.. Per l'identificazione di specie sono stati utilizzati sistemi commerciali tipo gallerie API, Biolog e Vitek; altri laboratori hanno utilizzato la tecnologia MALDI-TOF MS. Due laboratori hanno dichiarato di avere effettuato PCR per *Micoplasma* e due laboratori hanno fatto ricorso al sequenziamento per l'identificazione di ceppi batterici.

10 Discussione e conclusioni

10.1 Criticità segnalate dai laboratori partecipanti

Due laboratori hanno segnalato la mancanza di un campione prova che è stato inviato successivamente alla segnalazione dell'errore con spedizione dedicata in ghiaccio secco.

10.2 Considerazioni del laboratorio organizzatore

Le maggiori difficoltà si sono riscontrate con l'isolamento di *Trueperella pyogenes* e *Corynebacterium mastitidis*, microrganismi a crescita più lenta per i quali è necessaria una incubazione minima di 48 ore a 37 °C.

Si segnalano alcune imperfezioni tassonomiche o errori di digitazione nei risultati inseriti in Aquaweb.

NOTE

1) I laboratori, al momento dell'iscrizione al circuito interlaboratorio AQUA, sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric (L000XXX).

Ai sensi degli artt. 13 e 14 Reg UE 2016/679 si rende la presente informativa privacy. Titolare del trattamento: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE (in sigla IZSVE), con sede legale in 35020 LEGNARO (PD), Viale dell'Università 10, C.F. e P.IVA 00206200289, in persona del Direttore generale e legale rappresentante pro tempore tel 0498084242, e-mail dirgen@izsvenezie.it. In particolare, i dati verranno trattati dal personale delle strutture complesse che erogano il circuito AQUA. Responsabile della protezione dei dati dell'IZSVE ai sensi dell'art. 37 GDPR (RPD/DPO), contattabile all'indirizzo e-mail dpo@izsvenezie.it.

Tipologia di dati e fonti: dati comuni, anagrafici e identificativi. Provengono tutti dall'Interessato. Finalità e modalità: i dati saranno trattati per l'adempimento di obblighi legali connessi all'iscrizione / adesione al circuito Aqua; il trattamento avverrà in modo sia manuale/cartaceo, che elettronico. Base giuridica: il trattamento si fonda, oltre che sul consenso manifestato tramite conferimento volontario dei dati, sull'adempimento di un obbligo contrattuale nonché sul legittimo interesse del Titolare. Obbligatorietà: il conferimento dei dati è obbligatorio e la sua mancanza comporta l'impossibilità per il Titolare di eseguire la prestazione richiesta e di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua. Destinatari: i dati potranno essere comunicati a soggetti all'uopo Incaricati dal Titolare, a Responsabili del trattamento e consulenti del Titolare. Conservazione: i dati saranno conservati fino a revoca del consenso. Diritti: l'Interessato può esercitare i suoi diritti di accesso, rettifica, cancellazione, limitazione, portabilità, opposizione via email ai dati del Titolare di cui sopra. Reclamo: l'Interessato può proporre reclamo al Garante per la protezione dei dati personali. Revoca: il consenso può essere revocato, ma ciò potrebbe comportare l'impossibilità di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua o la cancellazione dell'iscrizione al circuito medesimo.

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

Circuito Interlaboratorio Microbiologia Diagnostica

Riferimenti

Responsabile Circuito Interlaboratorio 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

Il presente report è a cura di
Michela Corrò, Roberto Perin, Marzia Mancin

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



Data report 24/07/2023

-----Fine report definitivo -----