

Aqua

Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati

Circuito di Microbiologia Diagnostica Report schema AQUA MD 1-24

Circuito di Microbiologia Diagnostica

Schema AQUA MD1-24
Ricerca di *Taylorella equigenitalis*

ANNO 2024

Circuito di Microbiologia Diagnostica

Sommario

1.	Introduzione.....	4
1.1	Bibliografia.....	5
2.	Composizione dei campioni prova	5
3.	Indicazioni generali	6
3.1	Allestimento dei campioni prova	6
3.2	Raccomandazioni	6
3.3	Gestione dei campioni prova.....	6
4	Determinazioni e valori assegnati.....	7
5	Interpretazione dei risultati	7
6	Termini e abbreviazioni	7
7	Ruoli e responsabilità	8
8	Risultati.....	9
8.1	Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante.....	10
8.2	Statistica K di Cohen.....	11
8.3	Riassunto dei risultati	11
9	Altre elaborazioni	13
9.1	Sensibilità, specificità, esattezza	13
9.2	Tempistiche inizio prova	14
9.3	Monitoraggio della temperatura	14
10	Discussione e conclusione	15

1. Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, schema AQUA MD1- Ricerca *Taylorella equigenitalis*, 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 dei laboratori.

Partecipano al circuito sia laboratori territoriali dell'IZSve, sia laboratori di altri Istituti; i primi per l'esecuzione della prova, utilizzano la procedura PDP DIA 03, redatta secondo le linee guida indicate nel Manuale OIE; gli altri applicano le procedure di prova in uso presso le rispettive strutture.

Lo schema AQUA MD1 consta di una distribuzione/anno costituita da **dieci** campioni prova preparati con colture mono- o multi-specie (due o più ceppi) contenenti o meno *Taylorella equigenitalis* e da campioni sterili. Le colture multi-specie sono preparate abbinando ceppi batterici noti, oppure sono ottenute da selezioni di flora microbica prepuziale, prelevata da equini negativi per la presenza di *Taylorella equigenitalis*.

Per la preparazione delle sospensioni batteriche sono stati utilizzati microrganismi di riferimento (ATCC, NCTC) e/o isolati di campo identificati nel corso dell'attività diagnostica. Per l'allestimento dei campioni prova positivi si sono utilizzati sia ceppi di *T. equigenitalis* sensibili alla streptomicina, sia resistenti.

Ogni lotto di campioni prova prodotto è stato sottoposto a prove di vitalità, di omogeneità e di stabilità. Tali prove sono state ripetute il giorno della spedizione e quotidianamente fino al quarto giorno successivo alla stessa, in modo da garantire le caratteristiche dei campioni prova, anche nel caso di limitati ritardi dovuti a imprevisti durante la spedizione.

I campioni prova, opportunamente identificati, sono stati inviati a temperatura controllata (+2/+8°C), rispettando le condizioni previste dalla normativa vigente sul trasporto di materiale biologico.

I documenti di carattere generale del circuito (organizzazione, scheda di sicurezza) e i documenti specifici dello schema AQUA MD1 (protocollo con modalità operative, modalità per l'inserimento dei risultati, report) sono disponibili per i laboratori partecipanti sul sito AQUAWEB dell'IZSve (www.izsvenezie.it).

L'analisi 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 del singolo laboratorio. È stato inoltre calcolato un K complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

1.1 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” (2022) OIE, chapter 3.6.2.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2018 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura”
- ISO/IEC 17043:2023 “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

2. Composizione dei campioni prova

Campioni prova	Schema AQUA MD1-2024
1	<i>Taylorella equigenitalis</i> wild type ceppo di campo 12DIA-PD/5994; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo di campo 21/DIA-PD/8067
2	<i>Taylorella equigenitalis</i> wild type ceppo di campo 12DIA-PD/5994; <i>Oligella urethralis</i> ceppo di campo 19DIA-PD/3939/1
3	<i>Taylorella asinigenitalis</i> ceppo di campo. 11DIA-PD/5351
4	Sterile
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ceppo di campo 19DIA-PD/191
6	Sterile
7	<i>Oligella urethralis</i> ceppo di campo 19DIA-PD/3939/1
8	<i>Oligella urethralis</i> ceppo di campo 19DIA-PD/3939/1; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ceppo di campo 19DIA-PD/191
9	<i>Taylorella equigenitalis</i> sensibile alla streptomicina ceppo di campo 19DIA-PD/3939/5
10	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184

3. Indicazioni generali

3.1 Allestimento dei campioni prova

Per la preparazione delle sospensioni batteriche mono- e multi-specie, si sono utilizzati sia ceppi batterici noti, di riferimento e/o di campo, sia campioni di flora microbica prepuziale equina, prelevata da soggetti negativi per *T. equigenitalis*, addizionata o meno con concentrazioni a diverso titolo del patogeno.

Si è quindi valutata la crescita in piastra dei singoli ceppi e delle combinazioni batteriche, selezionando quelle più idonee a simulare i campioni prepuziali e si sono preparati i campioni prova su matrice “tamponi con terreno di trasporto”.

Si sono inoltre svolte verifiche di vitalità, omogeneità e stabilità della componente microbica.

3.2 Raccomandazioni

Ai laboratori partecipanti sono state fornite indicazioni per la manipolazione e la conservazione dei campioni prova fino al momento dell'utilizzo (scheda di sicurezza e protocollo operativo disponibili in AQUAWEB) ed è stato richiesto di segnalare tempestivamente all'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.

3.3 Gestione dei campioni prova

Per la gestione dei campioni prova si è chiesto di procedere applicando i protocolli seguiti per la gestione dei campioni diagnostici inviati per la ricerca di *Taylorella equigenitalis* della propria struttura e di procedere con la semina dei campioni prova entro 48 ore dalla data di spedizione (intesa come data del prelievo) analogamente a quanto previsto per i tamponi genitali equini.

4 Determinazioni e valori assegnati

Determinazione	Valore assegnato
Ricerca di <i>Taylorella equigenitalis</i>	Presente/Assente

5 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.

6 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* riportata più avanti (paragrafo 8.2).

7 Ruoli e responsabilità

Responsabile schema 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

Note

I laboratori sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric.

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

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, email dirgen@izsvenezie.it. Dati del Responsabile della protezione dei dati (RPD/DPO): Avv. Piergiovanni Cervato, 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.

8 Risultati

Hanno partecipato allo schema AQUA MD1-2024 Ricerca di *Taylorella equigenitalis*, **trentadue** laboratori.



Figura 1: laboratori partecipanti schema AQUA MD1 - 2024

IZSve – Struttura Complessa Territoriale 3 – Laboratorio Diagnostica Clinica – Padova

Report definitivo del 20/12/2024

8.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante

CIRCUITO INTERLABORATORIO MD1-2024										
Codice Identificativo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Risultato atteso	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000332	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
L000352	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000359	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000370	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000383	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000389	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000390	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000392	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000396	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000432	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000437	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000440	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000455	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000456	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000457	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000460	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000464	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000465	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000477	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000496	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000504	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000538	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000546	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000586	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000632	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000638	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000675	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000680	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000686	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000752	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000761	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L000937	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Corretto/totale	31/32	31/32	31/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32	32/32

8.2 Statistica K di Cohen

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

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).

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

La scala di *Landis & Koch*, di seguito riportata, è utilizzata per l'interpretazione dei valori dell'indice Kappa:

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

8.3 Riassunto dei risultati

Di seguito si riportano i risultati della concordanza tra esito atteso e risultato del laboratorio partecipante (Kappa) e il Kappa complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

	L000332	L000352	L000359	L000370	L000383	L000389	L000390	L000392	L000396
kappa	0,5833	0,7826	1	1	1	1	1	1	1
p-value	0,0325	0,0056	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008

	L000432	L000437	L000440	L000455	L000456	L000457	L000460	L000464	L000465
kappa	1	1	1	1	1	1	1	1	1
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008

	L000477	L000496	L000504	L000538	L000546	L000586	L000632	L000638	L000675
kappa	1	1	1	1	1	1	1	1	1
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008

	L000680	L000686	L000752	L000761	L000937	Complessivo
kappa	1	1	1	1	1	0,9608
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000

(Leggenda: kappa = statistica K di Cohen; p-value = livello di significatività)

Circuito di Microbiologia Diagnostica

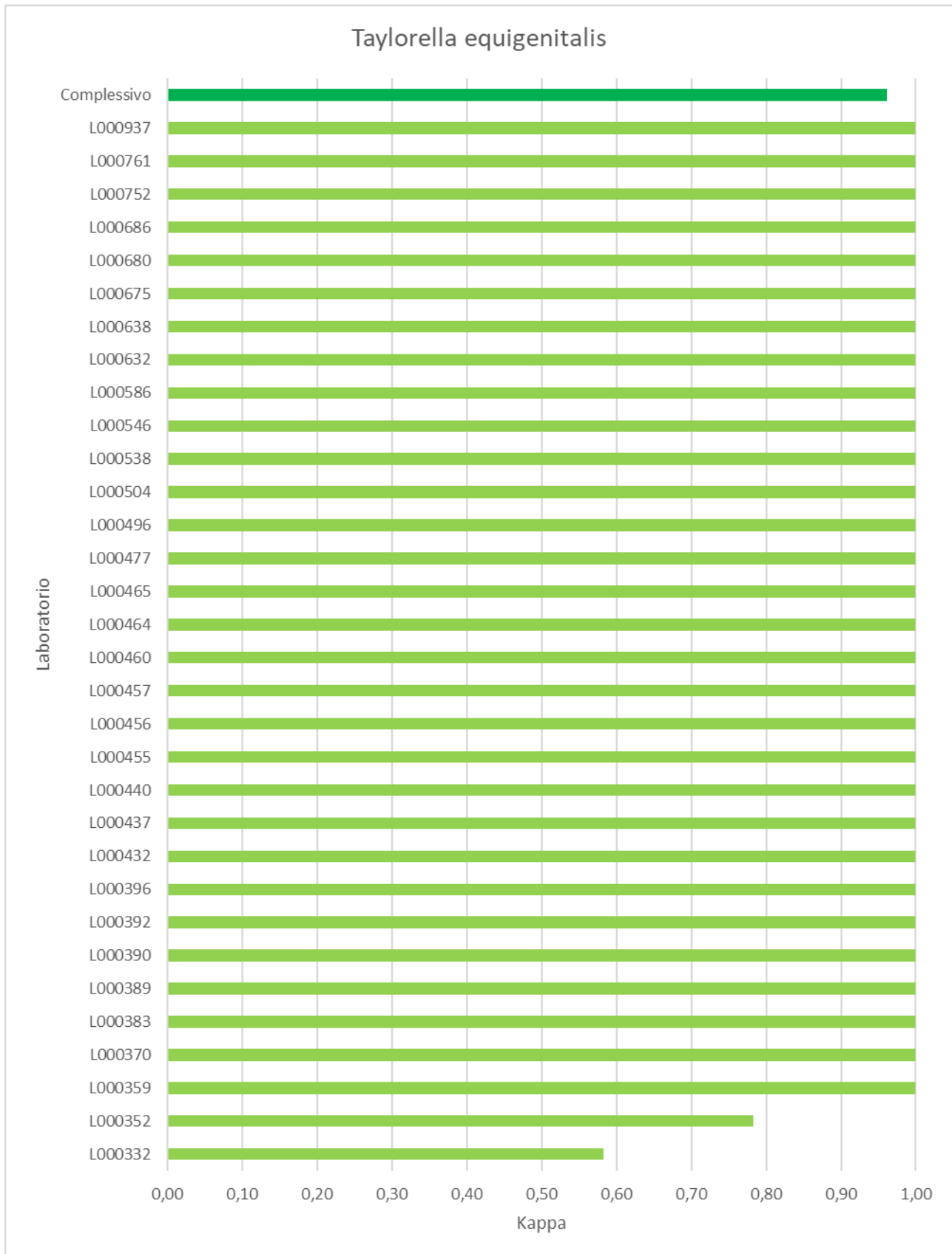


Figura 2: valori di Kappa dei singoli laboratori (verde chiaro) e K complessivo (verde scuro), dello schema AQUA MD1 2024
IZSve – Struttura Complessa Territoriale 3 – Laboratorio Diagnostica Clinica – Padova

Report definitivo del 20/12/2024

Tutti i laboratori presentano un K ottimo, eccetto i laboratori L000352 e L000332 che hanno ottenuto un accordo rispettivamente buono e moderato.

La concordanza tra tutti i laboratori è ottima.

9 Altre elaborazioni

9.1 Sensibilità, specificità, esattezza

Caratteristiche dello schema MD1			
Ricerca <i>Taylorella equigenitalis</i>			
valore rilevato	Valore assegnato		
		presente	assente
	presente	1899	48
	assente	124	2544
	subtotale	2023	2592
totale	4615		

sensibilità	93,87	IC ₉₅ [92,73; 94,88]
specificità	98,15	IC ₉₅ [97,55; 98,63]
esattezza	96,27	IC ₉₅ [95,68; 96,80]

Figura 3: sensibilità, specificità ed esattezza

Sensibilità: capacità d'identificare correttamente i campioni positivi.

La sensibilità nella tabella è data da $1899/(1899+124)$: dove **1899** sono i campioni positivi correttamente identificati, **124** i campioni positivi riportati come negativi dai laboratori partecipanti e $(1899+124)$, **2023** i campioni effettivamente positivi distribuiti nel corso degli anni.

Specificità: capacità d'identificare correttamente i campioni negativi.

La specificità nella tabella è data da $2544/(48+2544)$: dove **2544** sono i campioni negativi correttamente identificati, **48** sono i campioni negativi riportati come positivi dai laboratori partecipanti e $(48+2544)$, **2592** i campioni effettivamente negativi distribuiti nel corso degli anni.

Circuito di Microbiologia Diagnostica

Esattezza: è il grado di corrispondenza tra il dato atteso e quello effettivamente riscontrato. L'esattezza nella tabella è data da $(1899+2544)/4615$ dove $(1899+2544)$, **4443** sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati e **4615**, è il totale dei campioni distribuiti nel corso degli anni.

Sensibilità, specificità ed esattezza, sono definite attraverso una proporzione e quindi assumono valori compresi fra 0 e 1.

La sensibilità e la specificità del circuito interlaboratorio sono state rispettivamente del **93,87 %** e del **98,15 %**, l'esattezza del **96,27 %**.

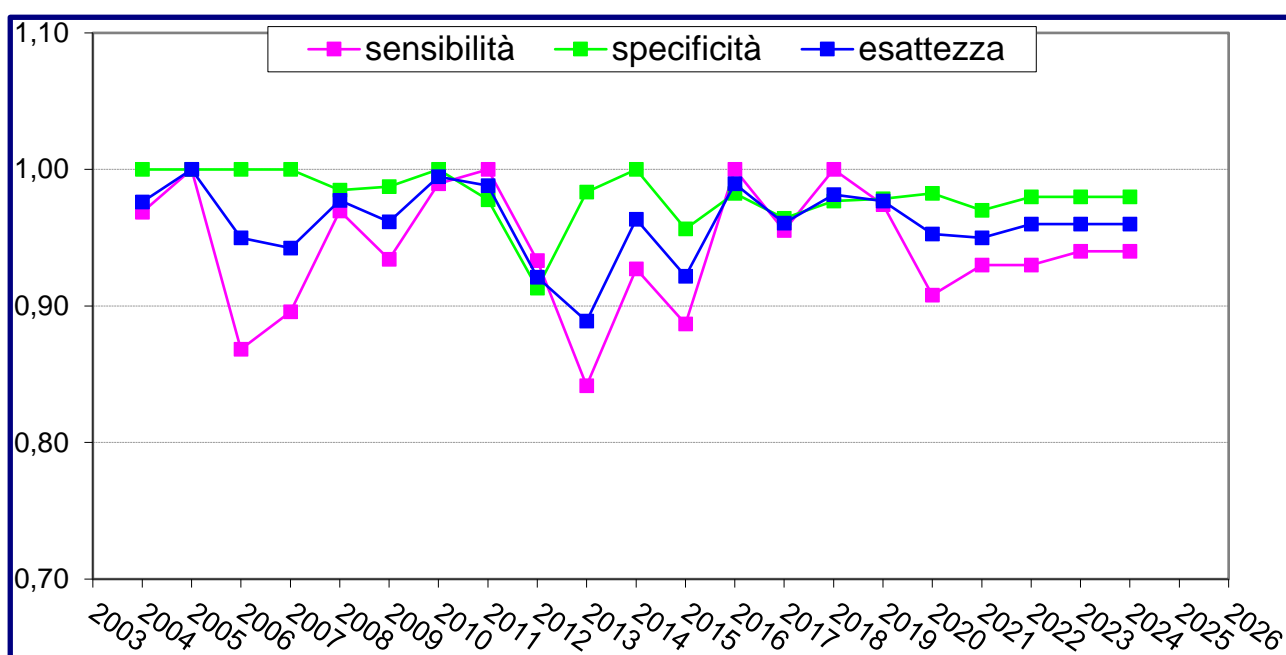


Figura 4: andamento di sensibilità, specificità ed esattezza nel periodo 2003-2024

In totale dal 2003 al 2024 sono stati distribuiti n° 4655 campioni prova, di cui 2058 positivi per *Taylorella equigenitalis* e 2597 negativi.

9.2 Tempistiche inizio prova

Dall'analisi dei tracciati di spedizione, i campioni prova sono stati consegnati entro 48 ore dalla spedizione a eccezione di tre laboratori che li hanno ricevuti il terzo giorno. Tutti i laboratori hanno iniziato l'analisi entro ventiquattro ore dal ricevimento.

9.3 Monitoraggio della temperatura

Per il rilievo della temperatura dei campioni all'arrivo è stato inserito in ogni confezione di campioni per i laboratori non IZSve, un campione d'appoggio, solo quattro laboratori hanno

IZSve – Struttura Complessa Territoriale 3 – Laboratorio Diagnostica Clinica – Padova

Report definitivo del 20/12/2024

comunicato la temperatura di arrivo; per i laboratori IZSVe sono stati utilizzati dei microdata logger inseriti nelle confezioni dei campioni. I dati in nostro possesso mostrano valori all'interno dei range di temperatura attesi.

10 Discussione e conclusione

Le performance dei laboratori sono risultate molto elevate, con un Kappa complessivo ottimo, nonostante la complessità dello schema e la natura dei campioni prova (simulati di campione prepuziale su matrice tampone).

Per quanto riguarda il campione numero 3, da considerarsi negativo, la maggior parte dei laboratori ha segnalato in campo note la presenza di *Taylorella asinigenitalis*, dando evidenza delle competenze tecniche e diagnostiche di riconoscere e distinguere tra due specie microbiche simili, ma con diverso ruolo patogeno.

A causa di un problema di stabilità, rilevato nei controlli post-spedizione a 48 ore, che avrebbe potuto compromettere i risultati delle analisi, si è deciso di preparare e inviare nuovamente i campioni prova ai laboratori partecipanti in modo da garantire a tutti condizioni operative uniformi e risultati comparabili.

Dr.ssa Michela Corrò

SCT 3 - Laboratorio Diagnostica Clinica –Padova
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Viale dell'Università n° 10, 35020 Legnaro (PD)
☎ (+39) 0498084156 - 0498084290
✉ e-mail: mcorro@izsvenezie.it

