



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
della Lombardia e dell'Emilia – Romagna “Bruno Ubertini”  
Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi**

## **CIRCUITO INTERLABORATORIO**

### **RICERCA DI LEPTOSPIRE PATOGENE IN CAMPIONI BIOLOGICI TRAMITE PCR**

**DISTRIBUZIONE 2018**

## **REPORT FINALE**

#### **COORDINATORE**

Dr.ssa Beatrice Boniotti

*Reparto Genomica*

Email [mariabeatrice.boniotti@izsler.it](mailto:mariabeatrice.boniotti@izsler.it)

Telefono 030 2290273

#### **ESPERTO STATISTICO**

Dr.ssa Veronica Cappa

*Reparto Sorveglianza Epidemiologica*

Email [veronica.cappa@izsler.it](mailto:veronica.cappa@izsler.it)

Telefono 030 2290635

#### **COLLABORATORI TECNICI**

Sig.ra Anna Mangeli *Reparto Genomica*

Sig. Arturo Scalvenzi *Reparto Batteriologia*

## Sommario

1. INTRODUZIONE	2
1.2 Partecipanti	2
1.3 Riservatezza	3
2. MATERIALI E METODI	3
2.1 Preparazione dei campioni	3
2.2 Prove di omogeneità e stabilità delle aliquote	4
2.3 Distribuzione dei campioni ai laboratori	4
2.4 Analisi statistica	4
3. RISULTATI	5
3.1 Metodiche impiegate	5
3.2 Omogeneità e stabilità dei campioni	6
3.3 esiti qualitativi	7
3.3.1 Concordanza e accuratezza	7
3.4 Esiti quantitativi	8
4. CONCLUSIONI	9
5. BIBLIOGRAFIA	9

## 1. INTRODUZIONE

Il presente report descrive i risultati relativi al circuito di prove interlaboratorio, organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per la Leptosirosi (CRNL), inerente la prova per la ricerca di leptospire patogene tramite PCR (01/2019).

La partecipazione al circuito è riservata ai laboratori che eseguono la prova e ai quali viene richiesto di analizzare un gruppo di campioni di omogenato di rene suino con le metodiche PCR utilizzate per la diagnosi di leptosirosi.

L'obiettivo generale del circuito è quello di fornire ai partecipanti informazioni sullo standard di qualità di esecuzione della prova nell'ottica di un miglioramento continuo delle proprie prestazioni. In particolare, ciò avviene attraverso la valutazione della capacità di:

- identificare correttamente i campioni positivi o negativi;

### 1.1. GESTIONE ORGANIZZATIVA E PIANIFICAZIONE

La partecipazione al circuito viene regolamentata dall'iscrizione mediante un software gestionale al quale i partecipanti accedono, via web, utilizzando le credenziali personali. Tale software costituisce inoltre il supporto per:

- assegnazione automatica, a ciascun laboratorio partecipante, di un codice alfa numerico;
- pubblicazione del protocollo operativo del circuito;
- numerazione automatica, differenziata per laboratorio, dei campioni;
- invio dell'e-mail informativa dell'invio dei campioni;
- inserimento esiti delle prove;
- pubblicazione report finale del circuito.

Il software consente inoltre di visualizzare le date di scadenza, previste dal calendario del circuito, di cui di seguito vengono fornite le specifiche:

SCADENZA	AZIONE
25/01/2019	Invio inviti iscrizioni
04/02/2019	Termine ultimo iscrizioni
11/02/2019	Spedizione campioni
31/03/2019	Termine inserimento esiti prove

### 1.2 Partecipanti

I laboratori che hanno aderito al circuito sono stati:

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (Roma)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Portici)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Salerno)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (Torino)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (Sassari)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (Palermo)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (Fermo)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (Perugia)

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Padova)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (Modena)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (Parma)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (Pavia)
- Clinica e Laboratorio Veterinario San Marco (Padova)

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna (Brescia), che ha organizzato il circuito, vi ha anche preso parte in qualità di quattordicesimo partecipante.

### 1.3 Riservatezza

I laboratori sono resi anonimi e identificati mediante un codice utilizzato per tutte le comunicazioni e per la pubblicazione del report finale. I dati, trattati in forma confidenziale e riservata, sia con strumenti informatici che su supporto cartaceo, vengono utilizzati dall'organizzatore del circuito esclusivamente per l'analisi e la valutazione dei risultati.

Il titolare del trattamento dei dati è l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna “Bruno Ubertini” con sede in Brescia, via Bianchi n. 9.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Preparazione dei campioni

A ciascun partecipante sono stati inviati 12 campioni di omogenato di rene di cui 9 positivi e 3 negativi.

I campioni positivi sono stati ottenuti mediante contaminazione artificiale con diverse concentrazioni di *L. borgpetersenii* sierovariante Sejroe, *L. interrogans* sierovariante Pomona e *L. interrogans* sierovariante Icterohaemorrhagiae.

Ogni campione è stato suddiviso in aliquote da 0,5 mL e congelato a  $-24 \pm 6$  °C

La composizione dei campioni, con gli esiti di riferimento, è riportata nella tabella 1.

Tabella 1 – Composizione campioni

N° CAMPIONE	SIEROVARIANTE	TITOLO (L./ML)
1	Icterohaemorrhagiae	10 <sup>5</sup>
2	Negativo	0
3	Icterohaemorrhagiae	10 <sup>6</sup>
4	Icterohaemorrhagiae	10 <sup>7</sup>
5	Pomona	10 <sup>5</sup>
6	Pomona	10 <sup>6</sup>
7	Negativo	0
8	Pomona	10 <sup>7</sup>
9	Sejroe	10 <sup>5</sup>
10	Sejroe	10 <sup>6</sup>
11	Sejroe	10 <sup>7</sup>
12	Negativo	0

I campioni inviati a ciascun laboratorio sono stati identificati ognuno con un codice numerico composto dal codice del laboratorio (a due o tre cifre) e da un codice a tre cifre, generato casualmente, riferito al singolo campione (tabella 2: gli identificativi dei laboratori sono riportati in grassetto).

Tabella 2 – Codifica dei campioni

CAMPIONI	IDENTIFICATIVO LABORATORIO													
	<b>18</b>	<b>53</b>	<b>59</b>	<b>73</b>	<b>75</b>	<b>77</b>	<b>148</b>	<b>188</b>	<b>266</b>	<b>269</b>	<b>270</b>	<b>284</b>	<b>287</b>	<b>288</b>
<b>1</b>	113	180	457	259	135	196	155	261	367	243	112	181	115	136
<b>2</b>	406	251	487	475	418	400	156	285	576	346	327	501	145	206
<b>3</b>	573	313	779	491	484	498	242	448	579	730	352	607	395	237
<b>4</b>	635	504	826	613	492	647	467	716	616	833	361	655	719	395
<b>5</b>	840	919	849	651	510	878	538	760	758	954	396	695	779	416
<b>6</b>	955	956	977	904	648	942	556	764	908	998	787	913	991	554
<b>7</b>	401	344	141	127	170	148	425	167	102	183	228	308	128	175
<b>8</b>	444	446	358	238	223	194	455	480	206	192	500	420	190	289
<b>9</b>	628	635	380	382	310	231	643	608	434	198	592	511	850	347
<b>10</b>	676	690	408	397	624	684	659	665	462	454	598	663	893	380
<b>11</b>	696	698	415	400	656	696	844	671	833	602	786	912	951	531
<b>12</b>	765	930	727	632	797	877	944	746	849	818	964	914	959	823

## 2.2 PROVE DI OMOGENEITÀ E STABILITÀ DELLE ALIQUOTE

**Omogeneità:** due aliquote di ogni livello di concentrazione sono state analizzate prima dell'invio dei campioni ai laboratori partecipanti.

**Stabilità:** due aliquote di ogni livello di concentrazione sono state analizzate dopo il termine ultimo di invio dei risultati.

## 2.3 DISTRIBUZIONE DEI CAMPIONI AI LABORATORI

I campioni sono stati inviati, preceduti da avviso ai laboratori partecipanti, congelati in ghiaccio secco mediante corriere. A tutti i laboratori partecipanti è stato richiesto di comunicare mediante posta elettronica l'arrivo dei campioni (previsto entro 2 – 3 giorni dalla spedizione). I campioni sono pervenuti a tutti i laboratori entro 3 giorni dalla spedizione.

## 2.4 ANALISI STATISTICA

La valutazione dell'omogeneità e della stabilità delle aliquote è stata effettuata attraverso il test non parametrico di *Wilcoxon* per dati appaiati.

Gli esiti dei campioni sono stati espressi sia quantitativamente (Ct-PCR) sia qualitativamente in termini di positivi (P) e negativi (N). In particolare, quando l'esito qualitativo della PCR del laboratorio è uguale a quello atteso, si considera il risultato concordante, viceversa, quando l'esito è diverso da quello atteso, il risultato viene considerato discordante. L'indice di accuratezza è stato calcolato come proporzione dei risultati concordanti sul totale dei campioni eseguiti e la concordanza dei laboratori con il valore atteso è stata

determinata utilizzando l'indice K di Cohen (Cohen 1960). Infine, è stato misurato l'indice K di Fleiss (Fleiss 1971) che misura il grado di concordanza tra laboratori a livello generale. L'interpretazione di questi ultimi due indici è riportata nella tabella 3 (Landis e Koch 1977).

Tabella 3: interpretazione degli indici K di Cohen e K di Fleiss secondo Landis e Koch

<b>K score</b>	<b>Interpretazione</b>
<0	Nessun accordo
[0.0-0.20]	Accordo scarso
[0.21-0.40]	Accordo debole
[0.41-0.60]	Accordo moderato
[0.61-0.80]	Accordo considerevole
[0.81-1.0]	Accordo perfetto

I dati relativi ai valori Ct della PCR Real Time sono stati rappresentati graficamente attraverso boxplot escludendo i campioni risultati negativi alla PCR. I valori medi sono stati quindi confrontati globalmente attraverso il test non parametrico di Kruskal-Wallis, mentre per i confronti a coppie è stato utilizzato il test post-hoc di Tukey.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata presso il Reparto Sorveglianza Epidemiologica dell'IZSLER utilizzando il software R versione 3.5.1.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 METODICHE IMPIEGATE

Le metodiche utilizzate per l'estrazione di DNA sono riassunte nella tabella 3 mentre quelle utilizzate nei protocolli PCR sono riassunte nella Tabella 4.

Tabella 4. – Metodi di estrazione

<b>Laboratorio</b>	<b>Metodo di estrazione</b>
18	MagVet Universal Extraction Kit (ID VET)
53	QiAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
59	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
73	Minikit Dneasy Tissue (Qiagen)
75	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
77	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
148	One For All Vet Kit (Qiagen) estrazione semiautomatica
188	Kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Life Technologies)
266	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)
269	QIAamp cador Pathogen MINI KIT (Qiagen)
270	Kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Life Technologies)
284	Kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Life Technologies)
287	High pure PCR template preparation kit (Roche)
288	QIAamp cador Pathogen MINI KIT (Qiagen)

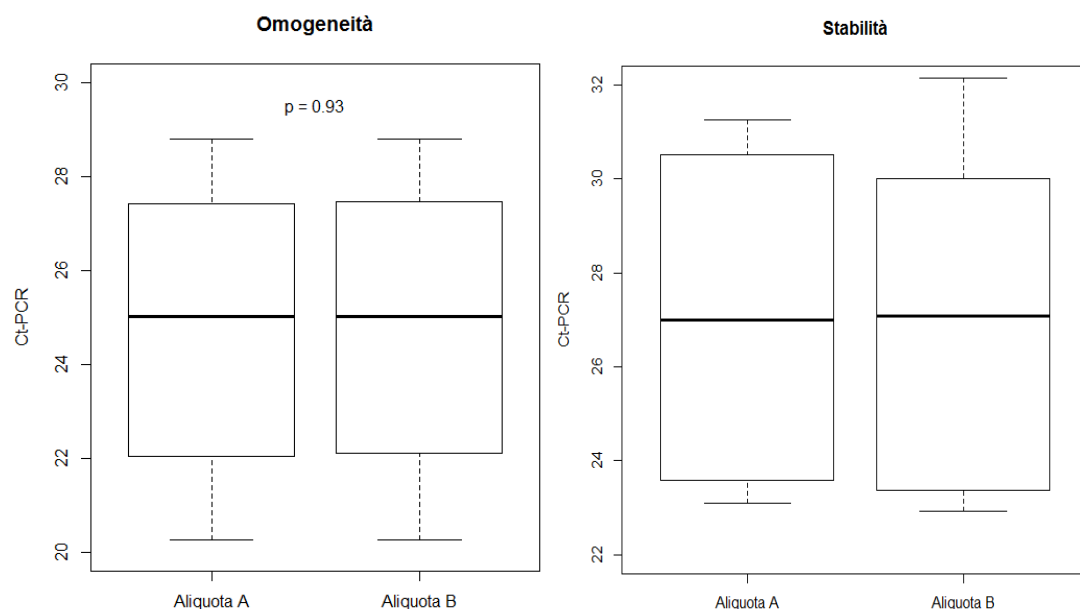
Tabella 5 – Metodi di rilevamento

LAB	TARGET	TIPOLOGIA DI PCR	SOGLIA DI POSITIVITÀ	CONTROLLO INTERNO DI ESTRAZIONE	CONTROLLO INTERNO DI AMPLIFICAZIONE	VALIDAZIONE
18	16SrRNA	Real-Time	≤38	No	No	Si
53	lipL32	Real-Time	40	Si	No	No
59	lipL32	Real-Time	≤38	No	Si	Si
73	lipL32	Real-Time	40	Si	Si	No
75	lipL32	Real-Time	40	No	Si	No
77	hap	End-point	//	No	No	No
148	lipL32	Real-Time	40	Si	Si	Si
188	lipL32	Real-Time	40	Si	Si	Si
266	lipL32	Real-Time	40	Si	Si	Si
269	lipL32	Real-Time	40	Si	No	Si
270	lipL32	Real-Time	40	Si	Si	Si
284	lipL32	Real-Time	40	Si	Si	No
287	LAO 322	SYBR green	//	No	Si	No
288	lipL32	Real-Time	//	No	No	Si

### 3.2 OMOGENEITÀ E STABILITÀ DEI CAMPIONI

L'omogeneità e la stabilità, eseguite analizzando aliquote indipendenti, rispettivamente prima dell'invio dei campioni e dopo il ricevimento dei risultati, sono state valutate favorevolmente non mostrando differenze statisticamente significative tra un'aliquota e l'altra (figura 1).

Figura 1 – Boxplot dei valori di Ct-PCR per la verifica dell'omogeneità e della stabilità e relativo p-value\*



\*p-value calcolato attraverso il test di Wilcoxon per dati appaiati

### 3.3 ESITI QUALITATIVI

La tabella 6 riporta gli esiti qualitativi per tutti i 14 laboratori, la tabella 7 riporta i risultati dei valori Ct per i laboratori che applicano la Real Time PCR.

Tabella 6 – PCR: risultati qualitativi\* per campione del laboratorio del centro di referenza e dei laboratori partecipanti al ring test

Campioni	Risultato atteso	Codice laboratorio													
		18 RT	53 RT	59 RT	73 RT	75 RT	77 EP	148 RT	188 RT	266 RT	269 RT	270 RT	284 RT	287 RT	288 RT
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
9	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
11	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

\*RT = PCR Real Time ; EP: PCR end-point

Tabella 7 – PCR Real Time: Risultati comprensivi dei valori Ct

CAMPIONI	CODICE LABORATORIO													
	18	53	59	73	75	148	188	266	269	270	284	287	288	
1	33.53	33.20	32.34	32	34	32	32.01	32.26	34.66	33.66	32.67	28.9	34.37	
2		0		>50	0	0	0	0	45	0	0	0	0	
3	30.79	30.12	29.41	29.1	30.5	29.03	28.45	28.58	29.89	30.79	28.83	27	29	
4	27.14	26.97	26.24	25.2	27.3	25	24.84	25.51	23.58	28.29	26.38	21	25.8	
5	34.41	34.27	34.57	32.2	37.8	33	32.32	34.80	34.47	35.95	36.6	27.7	34	
6	29.11	29.94	32.05	28.9	34.4	29.88	29.62	29.56	32.43	31.68	32.54	26	34	
7		0		>50	0	0	0	0	45	0	0	0	0	
8	23.04	26.29	26.63	24.4	30.3	26.01	24.35	24.92	27.34	27.35	27.23	22	29.3	
9	34.30	33.61	33.01	32.7	34.6	33.29	32.1	32.14	34.96	33.93	32.67	29.7	34	
10	30.61	30.23	29.38	28.7	30.6	29	28.74	28.14	31.21	30.85	29.75	25	25.2	
11	26.75	26.20	26.70	24.4	26.7	26.7	24.57	24.70	24.25	26.87	25.15	22.4	25.2	
12		0		>50	0	0	0	0	45	0	0	0	0	

#### 3.3.1 Concordanza e accuratezza

Tutti i risultati ottenuti dai 14 laboratori partecipanti al ring test sono uguali a quelli attesi. Infatti, l'indice K di Fleiss è pari a 1 e questo indica una perfetta concordanza. A livello di singolo laboratorio, l'indice K di Cohen è pari a 1 e l'accuratezza risulta del 100%, confermando la concordanza perfetta con il valore atteso (tabella 8).



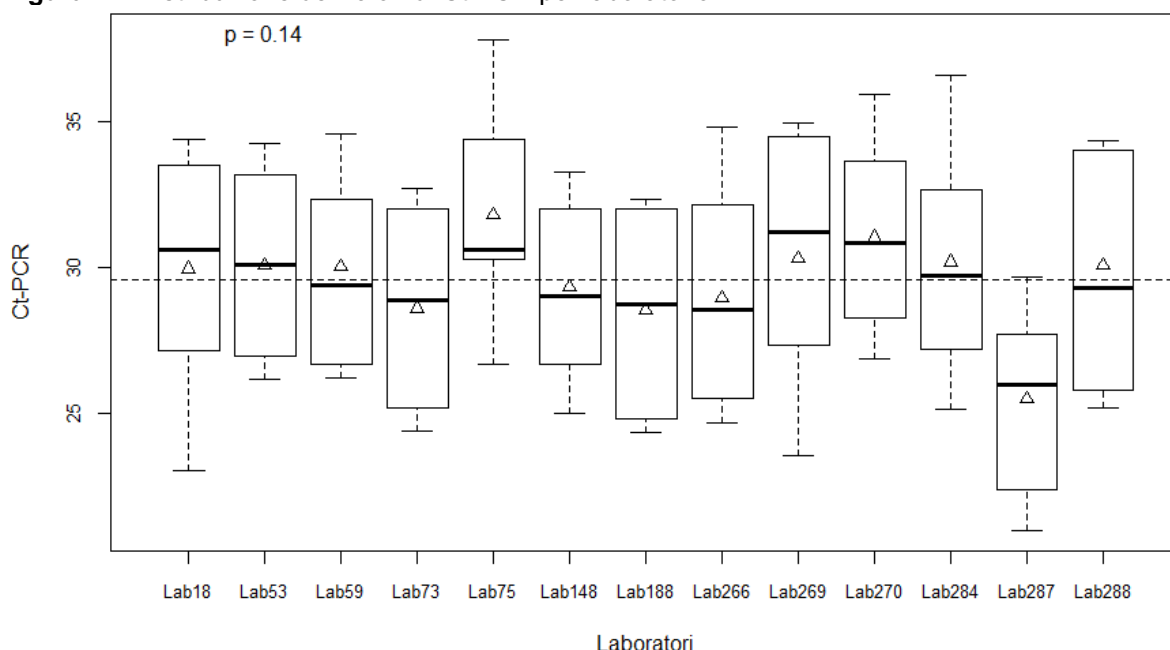
Tabella 8 – Numero di campioni analizzati, concordanza e accuratezza dei laboratori rispetto al CNRL

Laboratorio	N. campioni analizzati	K di Cohen	Accuratezza
Lab18	12	1	12/12
Lab53	12	1	12/12
Lab59	12	1	12/12
Lab73	12	1	12/12
Lab75	12	1	12/12
Lab77	12	1	12/12
Lab148	12	1	12/12
Lab188	12	1	12/12
Lab266	12	1	12/12
Lab269	12	1	12/12
Lab270	12	1	12/12
Lab284	12	1	12/12
Lab287	12	1	12/12
Lab288	12	1	12/12
<b>K di Fleiss</b>		1	

### 3.4 ESITI QUANTITATIVI

La figura 2 mostra la distribuzione di valori di Ct per laboratorio (ad esclusione del laboratorio 77 che esegue la PCR-End Point) ed emerge che il laboratorio 287 riporta valori più bassi rispetto agli altri. Nonostante, il test di Kruskal-Wallis non evidenzia differenze statisticamente significative nei valori di Ct ( $p=0.14$ ), è stato effettuato il test di Tukey per testare eventuali differenze tra coppie di laboratori ed è emerso che esiste una differenza statisticamente significativa tra il laboratorio 75 e il 287 ( $p=0.015$ ) mentre tutte le altre differenze non sono risultate statisticamente significative.

Figura 2 – Distribuzione dei valori di Ct PCR per laboratorio\*



\*la linea tratteggiata rappresenta la media dell'intero campione mentre i triangoli rappresentano il valore medio di Ct per ciascun laboratorio. Il p-value è stato calcolato attraverso il test di Kruskal-Wallis

#### 4. CONCLUSIONI

Complessivamente la prova valutativa ha mostrato un risultato ottimale e omogeneo tra i partecipanti. I risultati qualitativi ottenuti sono conformi per tutti e 14 i laboratori e i valori Ct delle prove in Real Time PCR sono risultati omogenei mostrando una sostanziale uniformità nella capacità di rilevamento e di diagnosi di leptospire patogene in campioni biologici da parte dei laboratori partecipanti. La differenza statisticamente significativa osservata tra il laboratorio 75 e 287 è probabilmente dovuta all'utilizzo da parte del laboratorio 287 di una metodica in SYBR green anziché con sonda Taqman come i restanti laboratori.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

1. Cohen, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 37-46;
2. Fleiss, J. L. (1971). Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin*, Vol. 76;
3. Landis J, Koch G (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*