



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 2016**

## **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 Nicoletta Vitale

*Reparto Sorveglianza Epidemiologica Lombardia*

Email [nicoletta.vitale@izsler.it](mailto:nicoletta.vitale@izsler.it)

Telefono 030 2290635

#### **COLLABORATORI TECNICI**

Sig.ra Anna Mangeli *Reparto Genomica*

Sig. Arturo Scalvenzi *Reparto Batteriologia*

## INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
1.1.	GESTIONE ORGANIZZATIVA E PIANIFICAZIONE	2
1.2	PARTECIPANTI	2
1.3	RISERVATEZZA	3
<b>2</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>3</b>
2.1.	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	3
2.2.	PROVE DI OMOGENEITÀ E STABILITÀ	4
2.3.	DISTRIBUZIONE	4
2.4	ANALISI STATISTICA	4
<b>3.</b>	<b>PRESENTAZIONE DEI RISULTATI</b>	<b>5</b>
3.1	METODICHE IMPIEGATE	5
3.2	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	5
3.3.	OMOGENEITÀ E STABILITÀ DEI CAMPIONI	6
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>6</b>
<b>5.</b>	<b>VALUTAZIONE STATISTICA</b>	<b>7</b>
5.1	ESITO QUALITATIVO	7
	5.1.1 ACCURATEZZA	7
	5.1.2 CONCORDANZA	8
5.2	ESITO QUANTITATIVO	9
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>10</b>

## 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 (01/2016).

La partecipazione al circuito è riservata ai laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) 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'email 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
29/11/2016	Invio inviti iscrizioni
02/12/2016	Termine ultimo iscrizioni
13/12/2016	Spedizione campioni
31/01/2017	Termine inserimento esiti prove

### 1.2 PARTECIPANTI

I laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali che hanno aderito al circuito sono stati:

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (Teramo)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (Roma)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Portici)
- 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)

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna (Brescia), che ha organizzato il circuito, vi ha anche preso parte in qualità di tredicesimo 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 Tarassovi, *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	Tarassovi	$10^7$
2	Tarassovi	$10^6$
3	Tarassovi	$10^5$
4	Negativo	0
5	Pomona	$10^7$
6	Pomona	$10^6$
7	Pomona	$10^5$
8	Negativo	0
9	Icterohaemorrhagiae	$10^7$
10	Icterohaemorrhagiae	$10^6$
11	Icterohaemorrhagiae	$10^5$
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												
	18	29	53	59	73	75	77	99	148	188	266	269	270
1	146	385	188	359	197	110	144	141	226	520	404	573	123
2	366	544	194	460	524	298	189	183	253	577	459	595	143
3	399	640	229	711	529	331	468	201	404	848	593	754	420
4	558	821	319	734	552	427	561	215	500	876	685	755	553
5	676	864	630	832	740	859	737	277	599	913	765	881	657
6	850	964	816	960	794	883	787	723	887	920	798	925	897
7	227	149	346	309	202	311	190	217	139	220	340	228	168
8	372	172	483	394	363	505	385	242	197	474	514	321	405
9	617	265	587	417	430	744	441	308	381	505	553	531	410
10	619	315	621	466	521	826	501	534	734	643	611	733	624
11	771	682	759	650	793	847	681	612	905	674	627	811	819
12	917	827	844	893	831	856	973	831	985	837	974	923	872

## 2.2 PROVE DI OMOGENEITÀ E STABILITÀ

**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

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 struttura deputata alla valutazione dei risultati è il Reparto Sorveglianza Epidemiologica Lombardia (SEL) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna, in collaborazione con il CRNL. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software R versione 3.3.1 con l'utilizzo del package “fmsb”.

Ai fini della valutazione statistica, i risultati delle prove condotte sui singoli campioni sono stati classificati come corretti quando conformi al risultato atteso. Sono state considerate due categorie di risultati: “Negativo” e “Positivo”.

L'analisi statistica è stata svolta ai fini di valutare i risultati ottenuti da ciascun laboratorio. Tale analisi è stata eseguita attraverso il calcolo dell'indice di accuratezza (proporzione dei risultati corretti) per ciascuno dei 13 laboratori partecipanti.

Il coefficiente K di Cohen è stato calcolato al fine di valutare la concordanza ottenuta fra gli esiti di ciascun laboratorio e il risultato atteso.

I valori Ct della PCR Real time sono stati analizzati tramite analisi della varianza non parametrica per verificare che non ci fossero differenze statisticamente significative tra i laboratori.

L'omogeneità e la stabilità dei campioni sono state valutate con il test statistico di Wilcoxon per campioni appaiati.

### 3. PRESENTAZIONE DEI 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 3. – METODI DI ESTRAZIONE**

LABORATORIO	METODO DI ESTRAZIONE
18	High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
29	Maxwell 16 DNA purificato kit (Promega)
53	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)
59	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
73	Minikit Dneasy Tissue (Qiagen)
75	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
77	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
99	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)
188	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)
266	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)
148	Kit colonnine (TEMA Ricerca)
269	QIAamp cadof Pathogen Mini kit (Qiagen)
270	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)

**TABELLA 4 – METODI DI RILEVAMENTO**

LAB	TARGET	TIPOLOGIA DI PCR	SOGLIA DI POSITIVITÀ	CONTROLLO INTERNO DI ESTRAZIONE	CONTROLLO INTERNO DI AMPLIFICAZIONE	VALIDAZIONE
18	16SrRNA	Real-Time (TaqMan)	Ct ≤38	no	no	no
29	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <38	no	sì	sì
53	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <40	sì	no	no
59	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <40	no	sì	sì
73	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <40	sì	sì	no
75	23SrDNA	End-point	//	sì	sì	no
77	hap	End-point	//	no	no	no
99	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <40	no	sì	no
148	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct ≤40	sì	sì	sì
188	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <40	sì	sì	sì
266	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct <40	sì	sì	sì
269	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct ≤40	no	sì	sì
270	lipL32	Real-Time (TaqMan)	Ct ≤40	sì	sì	sì

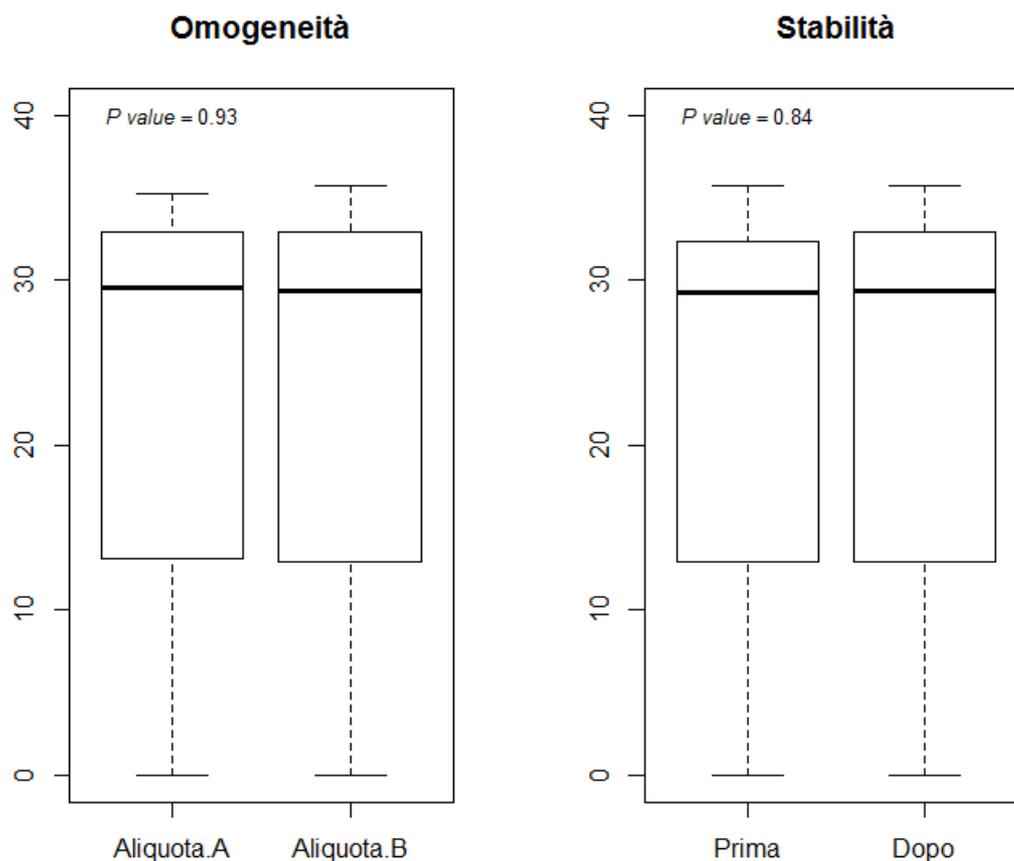
### 3.2 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Per ogni campione è stato richiesto di compilare, gli esiti (“positivo” o “negativo”).

Viene inoltre richiesto di indicare, nella scheda di registrazione dei risultati allegata al Protocollo operativo, i valore di Ct del gene target e i valori Ct dell'eventuale controllo di estrazione/amplificazione.

### 3.3 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** – LA DISTRIBUZIONE DEI VALORI DELLE DUE ALIQUOTE PER LA VERIFICA DI STABILITÀ E OMOGENEITÀ. PER LA VALUTAZIONE DELL'OMOGENEITÀ SONO STATE VALUTATE LE DUE ALIQUOTE A E B PRIMA DELL'INVIO DEI CAMPIONI. PER LA VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ SONO STATE CONFRONTATE DUE ALIQUOTE PRIMA E DOPO L'INVIO DEI CAMPIONI. IL TEST DI WILCOXON (I VALORI DEI P VALUE SONO MOSTRATI NELLA PARTE ALTA DEL GRAFICO) NON EVIDENZIA DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE.

### 4. RISULTATI

I risultati sono stati inseriti dai partecipanti direttamente nel software dedicato, utilizzando le credenziali di accesso fornite in fase di registrazione.

La tabella 5 riporta gli esiti qualitativi, mentre la tabella 6 riporta, per i laboratori che applicano la Real Time PCR, i risultati dei valori Ct . Gli esiti falsi negativi sono evidenziati in rosso.

**TABELLA 5 – PCR: RISULTATI QUALITATIVI**

CAMPIONI	RISULTATO ATTESO	CODICE LABORATORIO												
		18	29	53	59	73	75	77	99	148	188	266	269	270
		RT	RT	RT	RT	RT	EP	EP	RT	RT	RT	RT	RT	RT
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
6	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
7	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	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
11	P	P	N	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

EP: PCR end-point, RT: PCR Real Time

**TABELLA 6 – PCR REAL TIME: RISULTATI COMPRENSIVI DEI VALORI CT**

CAMPIONE	CODICE LABORATORIO												
	18	29	53	59	73	77	99	148	188	266	269	270	
1	25.9	24.1	26.15	25.68	26.8	23.6	25.2	24	23.45	24.93	19.23	25.54	
2	29.74	27.4	30.27	29.24	29.9	26.6	27.7	27	27.19	28.43	21.48	29.78	
3	33.71	31.9	34.35	32.64	33.7	30.8	31.5	31	29.87	31.79	26.3	32.17	
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
5	24.01	28.7	28.34	27.76	28.2	27.4	26	26	25.29	26.71	18.8	29.47	
6	27.97	N	32.35	31.33	30.8	31.9	29	29	27.97	30.25	22.21	32.78	
7	31.33	N	35.99	34.62	36.2	35.4	32.2	34	32.9	34.24	24.95	36.33	
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
9	24.46	24	27.19	26.23	27.3	23	26	25	23.52	25.62	18.72	26.36	
10	28.31	27	30.42	29.9	31.1	26.7	29	29	27.9	28.9	21.97	30.24	
11	31.95	N	34.88	33.3	34.3	29.8	31.5	32	31.21	32.61	24.95	33.54	
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

## 5. VALUTAZIONE STATISTICA

### 5.1 ESITO QUALITATIVO

#### 5.1.1 Accuratezza

Nella tabella 7 è riportata la sintesi per ciascuno dei laboratori che hanno partecipato al ring test, effettuando le prove, oltre al risultato complessivo (totale di 156 campioni).

La colonna che indica l'accuratezza mostra che il 98% (153/156) dei campioni è stato correttamente classificato. Solo un laboratorio ha classificato in modo non corretto 3 campioni. L'intervallo di confidenza al 95% indica un limite inferiore per l'accuratezza pari al 94,5%.

**TABELLA 7 – ACCURATEZZA DEGLI ESITI PER CIASCUN LABORATORIO E PER IL TOTALE DI ESSI. GLI INTERVALLI DI CONFIDENZA SONO CALCOLATI UTILIZZANDO IL METODO BINOMIALE ESATTO**

LABORATORIO	RISULTATI CORRETTI/TOTALE	ACCURATEZZA	95% C.I.	
18	12/12	1	0.735	1
29	9/12	0.75	0.428	0.945
53	12/12	1	0.735	1
59	12/12	1	0.735	1
73	12/12	1	0.735	1
75	12/12	1	0.735	1
77	12/12	1	0.735	1
99	12/12	1	0.735	1
148	12/12	1	0.735	1
188	12/12	1	0.735	1
266	12/12	1	0.735	1
269	12/12	1	0.735	1
270	12/12	1	0.735	1
<b>TOTALI</b>	<b>153/156</b>	<b>0.98</b>	<b>0.945</b>	<b>0.996</b>

### 5.1.2 Concordanza

Per confrontare l'efficacia dei risultati con il valore atteso viene utilizzato il parametro statistico K di Cohen, che permette di calcolare il valore della concordanza fra i risultati di ciascun laboratorio e il valore atteso al netto della concordanza che si avrebbe con una classificazione puramente casuale dei campioni. In altre parole, l'indice K di Cohen indica quanta parte della corretta identificazione di ciascun laboratorio sia dovuta alla reale capacità del laboratorio eseguire la prova e non sia dovuta alla casualità.

L'indice Kappa di Cohen viene calcolato, per ciascun laboratorio, mediante una tabella a doppia entrata fra gli esiti forniti dal laboratorio e quelli attesi (gold standard). Tale matrice prende il nome di “matrice di confusione”.

Per tutti i laboratori, eccettuato il 29, è possibile generare la seguente “matrice di confusione”.

		GOLD STANDARD		
		POSITIVI	NEGATIVI	TOTALI
ESITO LABORATORI	POSITIVI	9	0	9
	NEGATIVI	0	3	3
	TOTALI	9	3	12
<b>KAPPA DI COHEN</b>		1.00		

Un valore per la K di Cohen pari a 1 indica perfetta concordanza tra i laboratori presi in considerazione e il valore atteso.

Per il laboratorio 29, invece la “matrice di confusione” corrispondente ai risultati è la seguente:

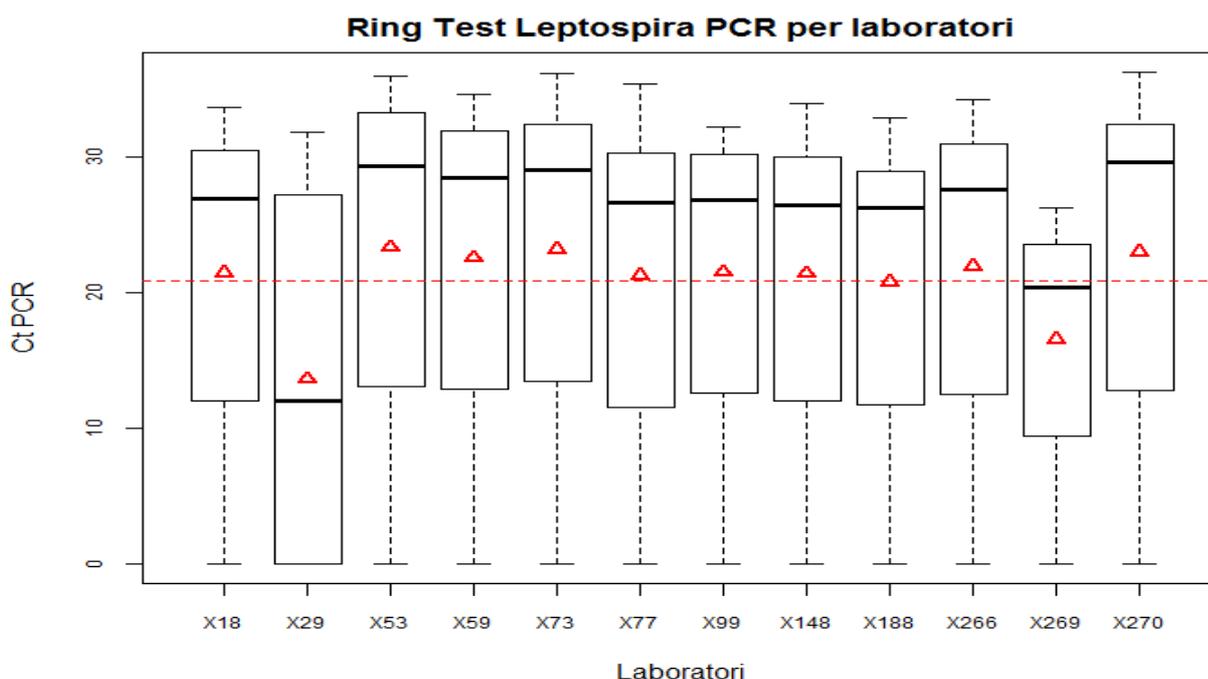
		GOLD STANDARD		
		POSITIVI	NEGATIVI	TOTALI
ESITO LABORATORI	POSITIVI	6	3	9
	NEGATIVI	0	3	3
	TOTALI	6	6	12
KAPPA DI COHEN		0.5	95% C.I. (0.1 ; 0.99)	

Adottando la classificazione utilizzata da Landis & Koch (1977), un valore per il K di Cohen pari a 0.5 indica una concordanza moderata tra i risultati attesi e gli esiti del laboratorio. L'intervallo di confidenza al 95% per il valore di K ha come limite inferiore il valore 0.1 (concordanza lieve) e come limite superiore 0.99 (perfetta concordanza). Questo permette di sostenere che vi sia una concordanza comunque accettabile anche tenendo conto della non elevata numerosità di campioni. Il test per verificare che la K di Cohen sia statisticamente uguale a 0 (non concordanza) restituisce un p-value uguale a 0.04, indicando che statisticamente anche il laboratorio 29 mostra un accordo accettabile con i risultati attesi.

Infine è stata calcolato a scopo descrittivo un indice Kappa di Cohen globale su tutti i risultati che è risultato pari a 0.894 [95% C.I. (0.825 ; 0.964)].

### 5.2 ESITO QUANTITATIVO

Il grafico della figura 2 mostra la distribuzione di valori di Ct per laboratorio: in particolare i laboratori 29 e 269 presentano valori più bassi rispetto agli altri laboratori. Tuttavia la differenza non è statisticamente significativa (Kruskal-Wallis chi-squared = 15.981, df = 11, p-value = 0.1418)



**FIGURA 2** – LA DISTRIBUZIONE DEI VALORI DI Ct PCR PER LABORATORIO MOSTRA UNA SOSTANZIALE OMOGENEITÀ DELLA VARIANZA, AD ECCEZIONE DEL LABORATORIO 29. IL TEST DI KRUSKAL-WALLIS NON EVIDENZIA DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE.

## **6. CONCLUSIONI**

Complessivamente la prova valutativa ha mostrato un risultato soddisfacente e piuttosto omogeneo tra i partecipanti. I risultati qualitativi ottenuti sono conformi per 11 laboratori su 12 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.