



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

CIRCUITO INTERLABORATORIO

RICERCA DI LEPTOSPIRE PATOGENE IN CAMPIONI BIOLOGICI TRAMITE PCR

DISTRIBUZIONE 2022

REPORT FINALE

COORDINATORE

Dr.ssa Cristina Bertasio

Reparto Tecnologie Biologiche Applicate

Email cristina.bertasio@izsler.it

Telefono 030 2290308

ESPERTO STATISTICO

Dr.ssa Veronica Cappa

Reparto Sorveglianza Epidemiologica

Email veronica.cappa@izsler.it

Telefono 030 2290635

COLLABORATORI TECNICI

Sig.ra Eufrasia Peroni- Sig.ra Marzia Marchioni *Reparto Batteriologia*

Sommario

1. INTRODUZIONE	3
1.2 Partecipanti	3
1.3 Riservatezza	4
2. MATERIALI E METODI	4
2.1 Preparazione dei campioni	4
2.2 Prove di omogeneità e stabilità delle aliquote	5
2.3 Distribuzione dei campioni ai laboratori	5
2.4 Analisi statistica	6
3. RISULTATI	6
3.1 Metodiche impiegate	6
3.2 Omogeneità e stabilità dei campioni	8
3.3.1 Concordanza e accuratezza	9
3.4 Esiti quantitativi	10
4. CONCLUSIONI	11
5. BIBLIOGRAFIA	12

1. INTRODUZIONE

Il presente report descrive i risultati relativi al circuito di prove interlaboratorio, organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi (CRNL), inerente alla prova per la ricerca di leptospire patogene tramite PCR (01/2022).

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 leptospirosi.

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
15/09/2022	Invio inviti iscrizioni
30/09/2022	Termine ultimo iscrizioni
17/10/2022	Spedizione campioni
19/11/2022	Termine inserimento esiti prove

1.2 Partecipanti

I laboratori che hanno aderito al circuito sono stati:

- Università di Bologna-Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) - Bologna
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (Modena)
- IZS delle Venezie (Pordenone)
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (Parma)
- IZS delle Venezie - Laboratorio Virologia Diagnostica (Padova)
- IZS dell'Umbria e delle Marche - Laboratorio Diagnostica (Perugia)
- IZS della Sardegna - Dipartimento Sanità Animale (Sassari)
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (Bologna)

- IZS della Sicilia - Laboratorio Sierologia Generale (Palermo)
- IZS del Lazio e della Toscana - D.O. Diagnosi Malattie Virali (Roma)
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - SS Biotecnologie Applicate (Torino)
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (Pavia)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Salerno)
- IZS dell'Abruzzo e del Molise - Reparto Diagnostica Specialistica (Teramo)
- IZS dell'Umbria e delle Marche - Sezione Diagnostica (Fermo)
- IZS del Mezzogiorno - Laboratorio Biotecnologie Applicate alla Diagnostica (Portici)
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Laboratorio S.S. Diagnostica Sierologica (Torino)

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia–Romagna (Brescia), che ha organizzato il circuito, vi ha anche preso parte in qualità di diciottesimo 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. interrogans* sierovariante Australis, *L. interrogans* sierovariante Sejroe e *L. interrogans* sierovariante Pomona.

Ogni campione è stato suddiviso in aliquote da 0,5 mL e congelato a -24 ± 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	Pomona	10 ⁷
2	Negativo	
3	Pomona	10 ⁵
4	Pomona	10 ⁶
5	Negativo	
6	Australis	10 ⁵
7	Australis	10 ⁶
8	Australis	10 ⁷
9	Sejroe	10 ⁵
10	Negativo	
11	Sejroe	10 ⁶
12	Sejroe	10 ⁷

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	Identificativo Laboratorio																	
	18	29	53	59	75	77	93	117	148	188	266	269	270	284	300	305	315	50
1	161	119	165	152	165	193	146	104	106	107	181	113	123	159	125	151	201	165b
2	200	134	173	157	230	218	172	134	145	140	232	128	154	280	224	199	259	173b
3	231	189	291	215	336	286	200	136	177	273	235	139	194	320	502	222	284	291b
4	258	426	336	294	402	297	309	247	179	287	365	226	232	499	540	294	395	336b
5	260	475	419	342	434	366	496	267	235	332	377	307	246	548	588	337	476	419b
6	316	585	482	566	531	510	531	358	464	374	387	410	297	557	675	355	500	482b
7	319	662	512	580	599	642	735	515	548	482	389	575	317	749	766	685	514	512b
8	419	671	561	622	600	664	743	672	593	566	533	607	460	754	803	762	567	561b
9	706	727	733	669	719	751	754	696	632	645	709	615	745	826	817	796	813	733b
10	765	755	770	812	727	794	800	761	715	665	736	817	806	865	833	840	820	770b
11	824	834	800	956	852	951	818	823	771	827	800	873	930	908	865	979	901	800b
12	866	915	914	960	893	955	868	929	854	889	981	940	946	930	923	985	980	914b

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

K score	Interpretazione
<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 Dunn.

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata presso la Sorveglianza Epidemiologica dell'IZSLER utilizzando il software R versione 4.0.4.

3. RISULTATI

3.1 METODICHE IMPIEGATE

Le metodiche utilizzate per l'estrazione di DNA sono riassunte nella tabella 4 mentre quelle utilizzate nei protocolli PCR sono riassunte nella Tabella 5.

Tabella 4. – Metodi di estrazione

Laboratorio	Metodo di estrazione
18	ID gene TM Mag Universal extraction kit (Innovative Diagnostics)
29	Maxwell (Promega)
50	QIAGEN
53	Maxwell Viral Total TNA
59	QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
75	MagMax Core (Applied Biosystem)
77	QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
93	MagMax Core (Applied Biosystem)
117	Apex Kit MagMax Core (Applied Biosystems)
148	One for all vet kit (QIAGEN)
188	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)
266	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)
269	DSP Virus Pathogen Virus kit- QIASymphony (QIAGEN)
270	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)
284	Kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Invitrogen)
300	DNAeasy Blood And Tissue kit
305	Estrattore automatico QIASymphony
315	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)

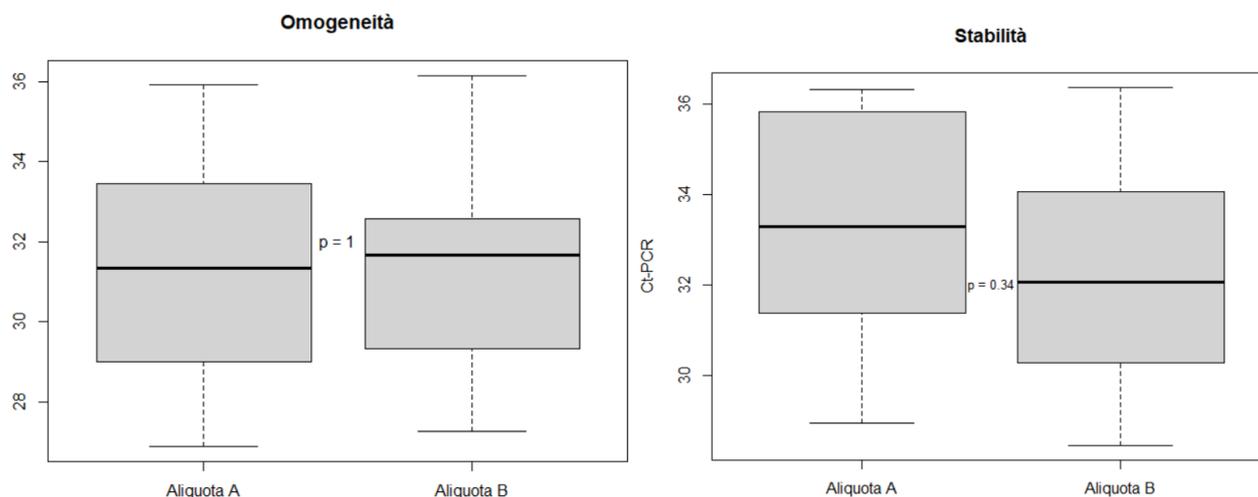
Tabella 5 – Metodi di rilevamento

LAB	TARGET	TIPOLOGIA DI PCR	CHIMICA	SOGLIA DI POSITIVITÀ	CONTROLLO INTERNO DI ESTRAZIONE	CONTROLLO INTERNO DI AMPLIFICAZIONE	VALIDAZIONE
18	16SrRNA	Real-Time	Taqman	38	NO	NO	SI
29	lipL32	Real-Time	Taqman	38	SI	SI	SI
50	lipL32	Real-Time	Taqman	40	NO	SI	NO
53	lipL32	Real-Time	Taqman	40	NO	SI	SI
59	lipL32	Real-Time	Taqman	38	NO	SI	SI
75	lipL32	Real-Time	Taqman	40	NO	SI	NO
77	lipL32	Real-Time	Taqman	//	NO	NO	NO
93	16SrRNA	Real-Time	Taqman	38	NO	NO	SI
117	lipL32	Real-Time	Taqman	40	SI	SI	SI
148	lipL32	Real-Time	Taqman	40	SI	SI	SI
188	lipL32	Real-Time	Taqman	40	SI	SI	SI
266	lipL32	Real-Time	Taqman	40	SI	SI	SI
269	lipL33	Real-Time	Taqman	40	NO	NO	SI
270	lipL32	Real-Time	Taqman	40	SI	SI	SI
284	lipL32	Real-Time	Taqman	//	SI	SI	SI
300	lipL32	Real-Time	Taqman	40	SI	NO	NO
305	lipL32	Real-Time	Taqman	38	NO	SI	NO
315	lipL32	Real-Time	SYBRgreen	38	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 18 laboratori, la tabella 7 riporta i risultati dei valori Ct. Gli esiti falsi negativi sono evidenziati in rosso.

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

Campioni	Identificativo Laboratorio																		
	18	29	50	53	59	75	77	93	117	148	188	266	269	270	284	300	305	315	
1	P	P	P	P	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	N	N	N	N
3	P	P	P	P	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	P	P	P	P
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
8	P	P	P	P	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	P	P	P	P
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N
11	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
12	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

*in rosso è stato evidenziato il risultato in disaccordo con il valore atteso

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

Campioni	Identificativo Laboratorio																	
	18	29	50	53	59	75	77	93	117	148	188	266	269	270	284	300	305	315
1	23,3	24,0	22,8	22,7	28,6	30,2	26,4	26,0	26,1	28,0	23,6	26,2	31,8	29,6	27,3	27,3	34,0	28,2
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	29,4	28,0	26,6	28,1	34,5	32,6	31,2	29,5	28,4	33,0	28,5	30,9	30,0	31,8	30,9	30,2	36,0	33,6
4	27,1	28,0	25,3	24,7	34,6	31,5	30,6	29,6	29,6	32,0	27,6	31,3	36,5	32,8	29,9	28,9	36,0	32,1
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	32,8	34,0	28,0	26,7	36,2	33,4	28,3	33,6	32,4	35,0	28,0	32,6	36,1	34,4	32,7	34,5	34,0	33,7
7	27,7	28,0	25,0	24,6	32,2	29,4	26,8	29,6	28,3	30,0	24,9	28,1	33,6	30,2	28,4	29,8	32,0	29,2
8	25,1	25,0	21,1	20,5	29,5	25,9	23,9	26,2	26,7	28,0	20,7	26,2	32,1	26,2	26,2	27,2	30,0	26,4
9	34,5	34,0	29,8	31,3	35,8	33,8	32,3	34,1	34,5	37,0	29,5	33,2	35,8	36,4	33,7	34,7	36,0	33,8
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	30,9	28,0	26,7	26,0	34,3	30,8	27,4	30,1	31,7	32,0	27,6	30,0	25,4	32,0	31,0	30,5	36,0	31,0
12	25,9	21,0	22,3	22,7	30,2	27,5	23,7	27,6	27,8	27,0	22,8	26,1	28,5	28,1	28,0	28,0	32,0	27,6

*in rosso è stato evidenziato il risultato in disaccordo con il valore atteso

3.3.1 Concordanza e accuratezza

In generale gli esiti dei laboratori partecipanti al ring test concordano con quelli attesi ad eccezione del decimo campione del laboratorio 305 che rileva un falso positivo.

Per 17 dei 18 laboratori partecipanti l'indice K di Cohen è pari a 1 e l'accuratezza risulta del 100%, ciò conferma la concordanza perfetta con il valore atteso, mentre, a causa del falso positivo, l'indice K di Cohen del laboratorio 305 risulta pari a 0.75 (accordo considerevole) e l'accuratezza è uguale 0.917 (11/12) (tabella 8). Infine, l'indice K di Fleiss, che misura il grado di concordanza tra laboratori a livello generale, indica una concordanza perfetta tra i laboratori partecipanti risultando pari a 0.976.

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

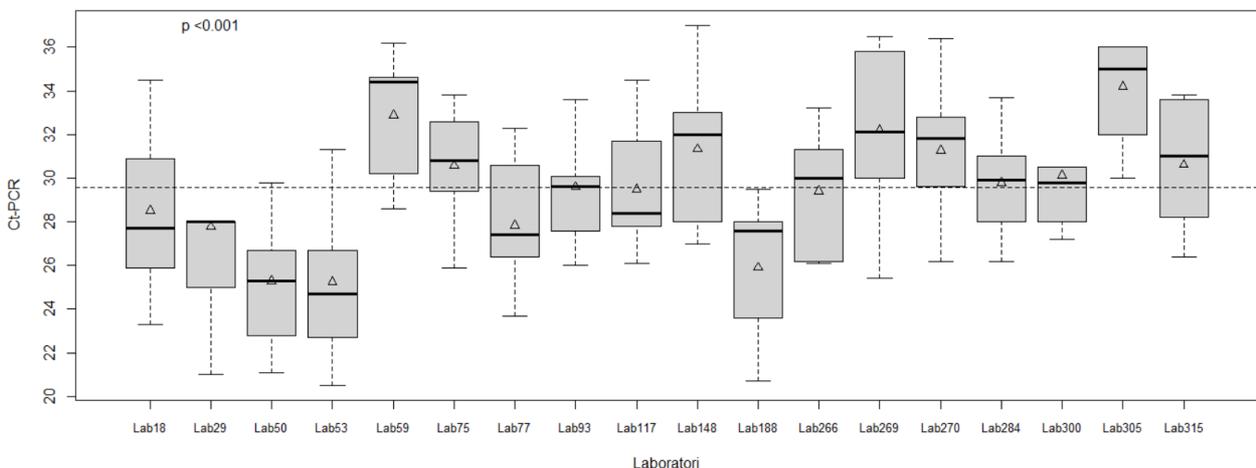
Laboratorio	N. campioni analizzati	K di Cohen	Accuratezza
Lab18	12	1	12/12
Lab29	12	1	12/12
Lab50	12	1	12/12
Lab53	12	1	12/12
Lab59	12	1	12/12
Lab75	12	1	12/12
Lab77	12	1	12/12
Lab93	12	1	12/12
Lab117	12	1	12/12
Lab148	12	1	12/12
Lab188	12	1	12/12
Lab266	12	1	12/12
Lab269	12	1	12/12
Lab270	12	1	12/12
Lab284	12	1	12/12
Lab300	12	1	12/12
Lab305	12	0.75	12/12
Lab315	12	1	12/12

K di Fleiss		0.976	
Laboratorio	N. campioni analizzati	K di Cohen	Accuratezza
Lab18	12	1	12/12
Lab29	12	1	12/12
Lab50	12	1	12/12
Lab53	12	1	12/12
Lab59	12	1	12/12
Lab75	12	1	12/12
Lab77	12	1	12/12
Lab93	12	1	12/12
Lab117	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
Lab300	12	1	12/12
Lab305	12	0.75	11/12
Lab315	12	1	12/12
K di Fleiss	0.976		

3.4 ESITI QUANTITATIVI

La figura 2 mostra la distribuzione di valori di Ct per laboratorio. Il test di Kruskal-Wallis evidenzia differenze statisticamente significative ($p < 0.001$), ciò significa che i valori medi di Ct sono statisticamente diversi tra loro e la distribuzione dei risultati è eterogenea. In particolare il test post-hoc di Dunn conferma valori medi di Ct statisticamente inferiori nei laboratori 50 (Ct mediano = 25.3), 53 (Ct mediano = 24.7) e superiori nei laboratori 59 (Ct mediano = 34.4) e 305 (Ct mediano = 35.0) rispetto ad alcuni laboratori (tabella 9).

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

Tabella 9 – Laboratori che riportano valori di Ct statisticamente diversi $p < 0.05$)

Confronto Laboratori		p-value
Lab50	Lab59	0.001
	Lab75	0.031
	Lab148	0.013
	Lab269	0.004
	Lab270	0.012
	Lab300	0.050
	Lab315	0.032
Lab53	Lab75	0.032
	Lab59	0.001
	Lab148	0.013
	Lab269	0.004
	Lab270	0.012
	Lab300	0.050
	Lab315	0.031
Lab59	Lab18	0.049
	Lab29	0.032
	Lab77	0.032
	Lab188	0.003
Lab188	Lab148	0.030
	Lab269	0.011
	Lab270	0.032
	Lab315	0.057*
Lab305	Lab18	0.013
	Lab29	0.006
	Lab50	0.0001
	Lab53	<0.0001
	Lab77	0.006
	Lab93	0.042
	Lab117	0.044
	Lab188	0.0002
Lab266	0.038	

*poco sopra il limite di significatività posto pari a 0.05

4. CONCLUSIONI

Considerando gli esiti qualitativi, la prova ha evidenziato un risultato ottimale tra i partecipanti (K Fleiss 0.976), le prove in Real Time PCR sono risultate omogenee mostrando una sostanziale uniformità nella capacità di rilevamento e di diagnosi di leptospire patogene da parte dei laboratori partecipanti. Nonostante ciò, i risultati quantitativi fanno emergere una differenza statisticamente significativa tra i valori di Ct, soprattutto per i laboratori 50, 53, 59 e 305. Probabilmente ciò è dovuto all'utilizzo di kit di estrazione e/o di amplificazione diversi che determinano variazioni nell'efficienza di amplificazione, che non compromette, comunque, la capacità di rilevamento delle leptospire patogene.

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*