



**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 2024

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 *Laboratorio Batteriologia Specializzata*

Sig. Marcello Fin *Laboratorio Batteriologia Specializzata*

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 Concordezza e accuratezza	8
3.4 Esiti quantitativi	9
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 Leptospirosi (CRNL), inerente la prova per la ricerca di leptospire patogene tramite PCR (01/2024).

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
01/12/2023	Invio inviti iscrizioni
31/01/2024	Termine ultimo iscrizioni
11/03/2024	Spedizione campioni
30/04/2024	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) (Ozzano Emilia)
- IZS dell'Abruzzo e del Molise - Reparto Diagnostica Specialistica (Teramo)
- IZS del Lazio e della Toscana - D.O. Diagnosi Malattie Virali (Roma)
- IZS della Sardegna - Dipartimento Sanità Animale (Sassari)
- IZS dell'Umbria e delle Marche - Sezione Diagnostica di Fermo
- IZS delle Venezie - Sezione Territoriale di Pordenone
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno -Sezione Salerno
- IZS della Sicilia - Laboratorio Sierologia Generale (Palermo)

- IZS dell'Umbria e delle Marche - Laboratorio Diagnostica (Perugia)
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - SS Biotecnologie Applicate (Torino)
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Lab diagnostica sierologica (Torino)
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sede Territoriale di Bologna
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sede Territoriale di Modena
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sede Territoriale di Pavia
- IZS del Mezzogiorno - Laboratorio Biotecnologie Applicate alla Diagnostica (Portici)
- IZS delle Venezie - Laboratorio Virologia Diagnostica (Legnaro)

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna (Brescia), che ha organizzato il circuito, vi ha anche preso parte in qualità di diciassettesimo 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* sierogruppo *Icterohaemorrhagiae* sierovariante *Icterohaemorrhagiae*, *L. borgpetersenii* sierogruppo *Sejroe* sierovariante *Hardjo* e *L. kirschneri* sierogruppo *Pomona* sierovariante *Mozdok*.

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	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	10 ⁴
2	Mozdok	10 ⁴
3	Hardjo	10 ⁵
4	Negativo	0
5	Negativo	0
6	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	10 ⁷
7	Mozdok	10 ⁵
8	Mozdok	10 ⁷
9	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	10 ⁵
10	Hardjo	10 ⁴

11	Hardjo	10 ⁷
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).

Tabella 2 – Codifica dei campioni

Campioni	Identificativo Laboratorio																
	16	18	29	53	59	75	77	93	117	188	266	269	270	284	300	305	315
1	215	126	104	169	123	236	139	139	136	106	157	167	136	185	127	164	259
2	220	349	179	181	173	282	160	168	275	157	192	195	147	210	129	203	264
3	341	373	285	182	274	372	194	375	446	203	233	328	162	352	185	260	405
4	380	377	329	204	456	387	311	465	487	241	357	385	172	400	343	368	413
5	425	439	552	243	487	432	318	487	514	658	454	471	333	498	444	455	415
6	585	567	570	358	506	549	743	489	669	701	608	494	356	557	501	490	440
7	588	598	593	371	580	633	783	518	753	771	615	705	722	726	553	553	443
8	686	650	625	376	611	643	883	578	769	776	648	708	778	733	556	755	469
9	702	725	709	388	697	671	894	601	783	782	658	710	789	859	685	835	494
10	861	742	764	476	793	704	933	712	828	787	661	755	855	882	689	965	600
11	941	754	767	670	935	919	942	784	932	839	876	757	881	892	696	969	864
12	986	890	931	773	986	967	971	853	968	959	995	955	980	950	839	995	966

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 il Reparto Sorveglianza Epidemiologica dell'IZSLER utilizzando il software R versione 4.3.1.

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

Laboratorio	Metodo di estrazione
16	Kit estrazione Promega
18	MagMax Core (Thermo Fisher Scientific)
29	Maxwell RSC-Promega
53	Maxwell Viral Total TNA (PROMEGA) & MagMax CORE (THERMO)
59	Estrazione automatizzata mediante piattaforma King Fisher (Thermofisher)
75	MagMAX Core (Thermo Fisher Scientific)
77	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
93	MagMAX Core Kit su King Fisher Flex (Thermo Fisher)
117	Nucleo Spin Tissue kit (Macherey Nagel)
188	PureLink genomic DNA Kit (Thermo Fisher)
266	Estrazione semi-automatica King Fisher Flex- kit INDIMag Pathogen (INDICAL)
269	DSP Virus Pathogen mini Kit - QIASymphony
270	NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel)
284	PureLink genomic DNA Kit (Thermo Fisher)

300	DNeasy blood and tissue kit
305	Estrazione automatizzata con kit “Magpure Animal Tissue Genomic DNA purification” (Big Fish)
315	Nucleo Spin Tissue (Macherey Nagel)

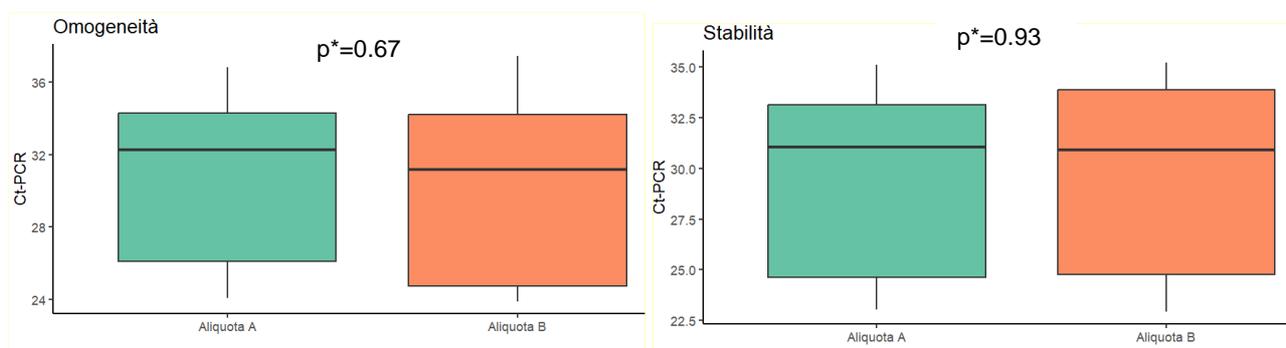
Tabella 5 – Metodi di rilevamento

LAB	TARGET	TIPOLOGIA DI PCR	SOGLIA DI POSITIVITÀ (Ct)	CONTROLLO INTERNO DI ESTRAZIONE	CONTROLLO INTERNO DI AMPLIFICAZIONE	VALIDAZIONE
16	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	SI	NO
18	16S rRNA	Taqman Real-time PCR	38	NO	NO	SI
29	LipL32	Taqman Real-time PCR	38	SI	SI	SI
53	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	NO	SI	SI
59	LipL32	Taqman Real-time PCR	38	NO	SI	SI
75	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	NO	SI	NO
77	LipL32	Taqman Real-time PCR	\\	NO	NO	NO
93	16S rRNA	Taqman Real-time PCR	38	NO	NO	SI
117	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	SI	SI
188	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	SI	NO
266	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	SI	SI
269	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	NO	SI	SI
270	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	SI	SI
284	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	SI	NO
300	LipL32	Taqman Real-time PCR	40	SI	NO	NO
305	LipL32	Taqman Real-time PCR	38	NO	SI	NO
315	LipL32	SYBR Green real time qPCR	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 17 laboratori, la tabella 7 riporta i risultati dei valori Ct.

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

Campioni	Identificativo Laboratorio*																
	16	18	29	53	59	75	77	93	117	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
2	P	P	P	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	P	P	P
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	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
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
8	P	P	N	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
10	P	P	N	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	P	P
12	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

*in rosso sono stati evidenziati gli esiti che non concordano con gli attesi

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

Campioni	Identificativo Laboratorio*																
	16	18	29	53	59	75	77	93	117	188	266	269	270	284	300	305	315
1	32,51	32,65	33	34,76	32,79	34	31	30,45	36,02	30,52	32,10	31,75	35,92	32,5	33,5	36	33,2
2	31,85	32,96	32	30,44	33,51	33,64	31,2	30,30	36,18	30,52	31,61	31,77	34,21	32,5	33,5	37	34,7
3	26,72	28,17	29	26,03	27,75	29,28	26,3	25,94	30,27	25,25	27,35	26,82	30,26	26,8	28,7	30	28,5
4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A	N/A	N/A
5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A	N/A	N/A
6	21,97	21,79	23	20,43	21,86	23,01	20,5	20,17	25,58	20,22	21,44	20,21	24,84	22,1	23,4	25	22,5
7	28,41	28,92	33	27,34	32,79	30,34	28,8	27,72	36,48	28,99	28,62	27,70	31,19	29,1	30,6	36	29,7
8	22,46	22,12	N/A	20,56	23,10	22,76	20,7	20,31	25,97	20,91	21,25	19,37	24,21	22,9	23,6	27	23,8
9	29,47	29,40	34	27,44	29,52	29,69	27,7	27,14	32,77	26,92	28,70	28,10	31,16	29,2	30,3	31	29
10	30,18	31,49	N/A	29,55	31,78	36,12	29,3	29,48	34,14	28,70	31,12	30,75	33,77	31,8	32,5	34	33,1
11	20,27	21,19	22	20,07	21,23	21,1	18	19,27	23,64	19,02	20,27	18,51	23,47	21,7	22,5	23	21,6
12	N/A	N/A	31	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A	N/A	N/A

*in rosso sono stati evidenziati gli esiti che non concordano con gli attesi

Al Laboratorio ID29 è stata spedita una seconda aliquota dei campioni per la ripetizione della prova. La ripetizione ha prodotto i risultati seguenti:

Tabella 8 – risultati quantitativi ottenuti dal laboratorio 29 nella seconda prova

Campioni	ID campione	Risultato*
1	104	N/A
2	179	N/A
3	285	27
4	329	N/A
5	552	N/A
6	570	22
7	593	29
8	625	21
9	709	28
10	764	N/A
11	767	19
12	931	N/A

*in rosso sono stati evidenziati i risultati errati rispetto agli attesi

3.3.1 Concordanza e accuratezza

I risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al ring test concordano perfettamente a quelli attesi ad eccezione dei campioni 1, 2 e 10 del laboratorio 29. Tuttavia, l'indice K di Fleiss indica una concordanza perfetta e statisticamente significativa risultando pari a 0.93 ($p < 0.001$).

A livello di singolo laboratorio, l'indice K di Cohen è pari a 1 e l'accuratezza risulta del 100% ciò conferma la concordanza perfetta con il valore atteso per tutti i laboratori ad eccezione del laboratorio 29 per il quale l'indice K di Cohen risulta pari a 0.50 (accordo moderato) e l'accuratezza risulta pari a 0.75 (9/12) (tabella 9).

Tabella 9 – Numero di campioni analizzati, concordanza e accuratezza dei laboratori rispetto al CNRL

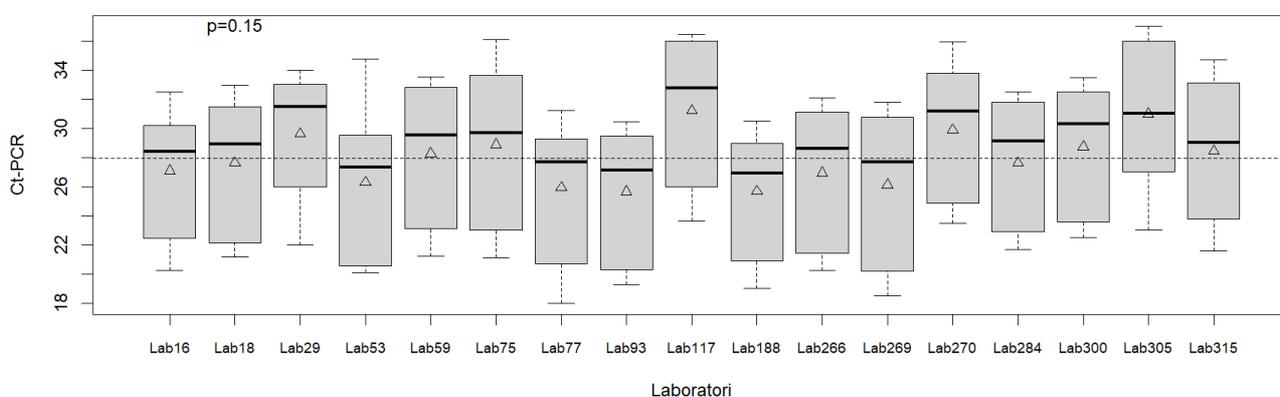
Laboratorio	N, campioni analizzati	K di Cohen	Accuratezza
16	12	1	12/12 (100%)
18	12	1	12/12 (100%)
29	12	0.5	9/12 (75%)
53	12	1	12/12 (100%)
59	12	1	12/12 (100%)
75	12	1	12/12 (100%)
77	12	1	12/12 (100%)
93	12	1	12/12 (100%)
117	12	1	12/12 (100%)
188	12	1	12/12 (100%)
266	12	1	12/12 (100%)
269	12	1	12/12 (100%)
270	12	1	12/12 (100%)
284	12	1	12/12 (100%)
300	12	1	12/12 (100%)

305	12	1	12/12 (100%)
315	12	1	12/12 (100%)
K di Fleiss		0.93 (p<0.001)	

3.4 ESITI QUANTITATIVI

La figura 2 mostra la distribuzione di valori di Ct tramite *boxplot*. Il test di Kruskal-Wallis non evidenzia differenze statisticamente significative (p=0,15) tra laboratori e il test a *post hoc* di Dunn che verifica eventuali differenze tra coppie di laboratori, conferma il risultato.

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



*la linea tratteggiata rappresenta la media dell'intero campione, 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 soddisfacente e omogeneo tra i partecipanti. I risultati qualitativi ottenuti sono conformi per tutti e 17 i laboratori, ad eccezione del 29, 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. Da notare che i risultati falsi negativi del laboratorio 29 sono stati ottenuti sui campioni con la concentrazione più bassa di leptospire nel campione.

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