



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Campylobacter

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Risultati della prova inter-laboratorio 2015 e programmazione per il 2016

Francesca Marotta


Teramo, 15-16 Dicembre 2015
Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi"





Circuiti Interlaboratorio *Campylobacter*

 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Prove Interlaboratorio	
Bluetongue	☞
Bluetongue PCR	☞
Brucella - Alimenti	☞
Brucella - Diagnostica	☞
Brucellosi	☞
Campylobacter Alimenti	☞
Campylobacter Diagnostica	☞
Campylobacter identificazione (PCR)	☞
Interlab Salmonella	☞
Listeria e Salmonella	☞
Listeria monocytogenes	☞
Morbo Coitale Maligno	☞
PPCB	☞
Rift Valley Fever	☞
Trichinella - Digestione enzimatica	☞
Virus Schmallerberg	☞
West Nile Disease	☞
West Nile Disease RT-PCR	☞
West Nile Disease Sierologico	☞

 MANUALE UTENTE

Partecipazione ai circuiti è riservata ai laboratori ufficiali del Sistema Sanitario Nazionale ed ai laboratori esteri ufficiali

<http://proveinterlaboratorio.izs.it/>





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazio

Distribuzione 05-2015- Campylobacter Alimenti



Lo Scopo: monitorare nel tempo le performances dei laboratori che effettuano le prove microbiologiche per ricerca e/o numerazione di *Campylobacter* da alimenti.

Metodi di prova da utilizzare

ISO 10272-1:2006 : Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Campylobacter* spp.

Parte 1: Metodo per la ricerca

Per la tipizzaz in pcr: Altro metodo in uso presso il laboratorio, validato





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale

Al circuito hanno partecipato 12 laboratori,
contrassegnati da codici numerici univoci

Ogni laboratorio ha ricevuto un set di
15 campioni di carne di pollo:

- 5 negativi (*E.coli* e *S.aureus*)
- 10 positivi (6 *C.jejuni* e 4 *C.coli*)



Tutti i laboratori hanno inserito i risultati entro la data prevista di
chiusura del circuito



Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Valutazione della STABILITA':

Analisi di 3 campioni ai tempi $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5$ e t_6 per un tot. di 21 campioni

Grafico II: Stabilità lotto C.jejuni

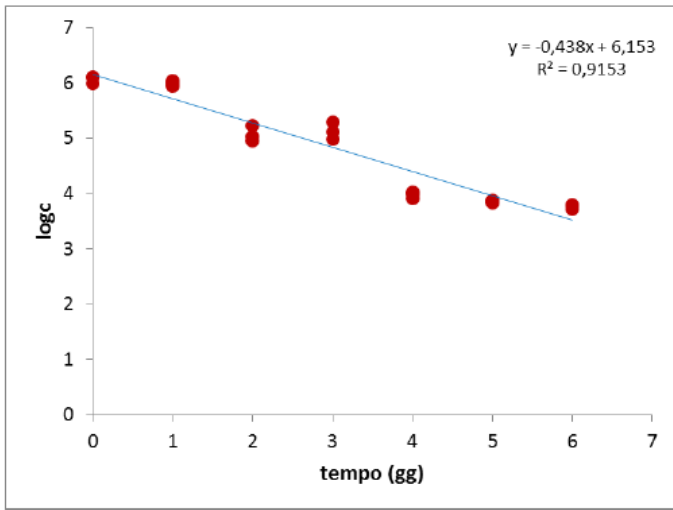
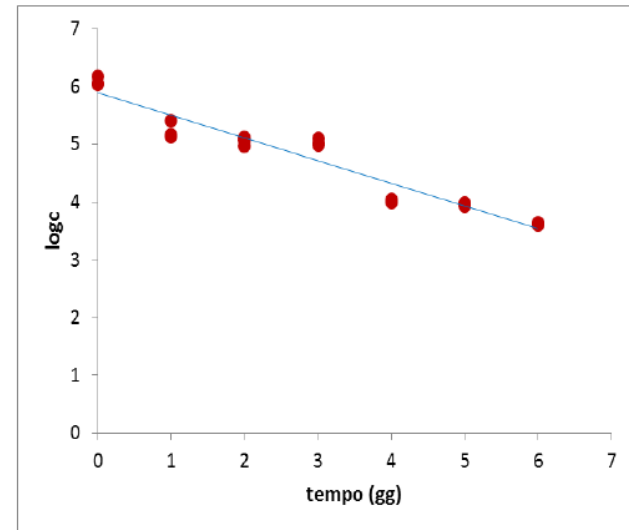


Grafico I: Stabilità lotto C.coli



I lotti sono risultati stabili

In tutti gli istanti, per tutte le ripetizioni è stata rilevata la presenza di

Campylobacter jejuni

$3,7 \times 10^3 \leq \text{UFC} \leq 6,04 \times 10^6$

Campylobacter coli

$3,6 \times 10^3 \leq \text{UFC} \leq 6 \times 10^6$





Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Valutazione della **OMOGENEITA'** attraverso il test Q di Cochran

$$T_2 = \sum_{i=1}^I \frac{\left(z_i - \frac{z_{..}}{I} \right)^2}{\frac{z_{..}}{I}}$$

zi=risultato del campione i;
I= num tot. di campioni esaminati in ciascun intervallo di tempo;
z..=somma dei risultati dei campioni esaminati in ciascun intervallo di tempo

Tabella I: Omogeneità lotto C.jejuni

	tempo 0	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4	tempo 5	tempo 6
media	6,069927	5,992291	5,074585	5,12964	3,978173	3,859315	3,769768
dev.st	0,07	0,06	0,14	0,15	0,06	0,03	0,05
min	5,987991	5,936331	4,954243	4,987991	3,907997	3,827839	3,714482
max	6,110896	6,048512	5,22812	5,286987	4,030489	3,877685	3,803705
CV	1,2%	0,9%	2,8%	2,9%	1,6%	0,7%	1,3%
T2	0,00166	0,00105	0,00772	0,00879	0,00201	0,00039	0,00124
variation between samples	0,00083	0,00053	0,00386	0,00439	0,00100	0,00019	0,00062
g.d.l	2	2	2	2	2	2	2

Tabella II: Omogeneità lotto C.coli

	tempo 0	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4	tempo 5	tempo 6
media	6,085084	5,238564	5,049386	5,032407	4,009903	3,959457	3,621297
dev.st	0,07	0,15	0,07	0,06	0,03	0,03	0,01
min	6,037789	5,137584	4,971445	4,983913	3,987991	3,92709	3,61182
max	6,165433	5,407314	5,110896	5,101622	4,037789	3,975641	3,630705
CV	1,1%	2,8%	1,4%	1,2%	0,6%	0,7%	0,3%
T2	0,00161	0,00826	0,00201	0,00150	0,00032	0,00040	0,00005
variation between samples	0,00080	0,00413	0,00100	0,00075	0,00016	0,00020	0,00002
g.d.l	2	2	2	2	2	2	2

Il num. dei campioni da analizzare è stato calcolato sulla base della formula definita dall'ILAC*

$$3x\sqrt[3]{n}$$

n = numerosità del lotto considerato

*ILAC Discussion Paper Homogeneity and Stability Testing Convenor et al., 2008

I lotti sono risultati omogenei per l'intero periodo considerato





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Tabella 1. Decodifica campioni

Identificativo laboratorio	Identificativo campione														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
659	1	14	100	21	157	31	71	62	16	45	153	79	114	88	104
660	143	13	126	36	61	80	17	98	89	77	70	150	47	52	137
711	30	154	63	103	29	32	107	2	105	91	148	159	134	6	81
712	178	175	176	180	170	172	179	177	171	169	167	166	173	174	168
713	160	38	12	68	117	42	149	33	138	131	54	162	92	82	121
715	25	40	136	125	11	127	76	99	65	101	60	165	69	86	26
716	123	83	164	112	95	145	129	158	109	78	96	67	156	113	132
732	48	128	64	144	130	135	84	18	146	50	27	75	3	73	34
737	85	141	133	102	120	28	161	56	115	4	139	163	57	55	19
738	140	90	66	5	10	41	151	97	72	22	108	8	124	44	122
766	37	110	58	51	15	119	106	9	23	116	24	93	20	155	152
848	39	7	49	35	43	94	74	118	142	147	111	59	53	46	87





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Valutazione statistica dei risultati

Ciascun campione esaminato viene indicato dal laboratorio organizzatore come **errato** o **corretto**.

I risultati delle prove sono stati interpretati come **errati** o **corretti**, sulla base della loro corrispondenza ai risultati attesi.

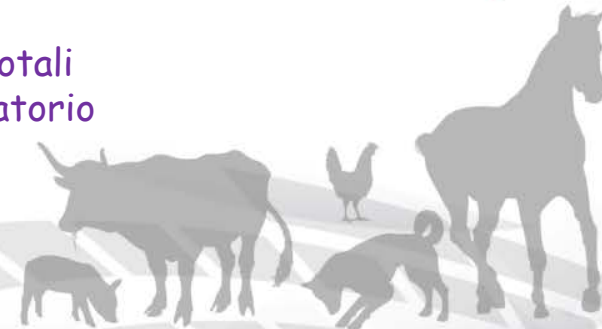


E' stata quindi stimata la probabilità che il laboratorio fornisca risultati esatti attraverso l'impiego di una distribuzione Beta ($s+1;n-s+1$), con intervallo di confidenza al 95%



s =numero dei risultati corretti
forniti da ciascun laboratorio

n =numero dei risultati totali
forniti da ciascun laboratorio



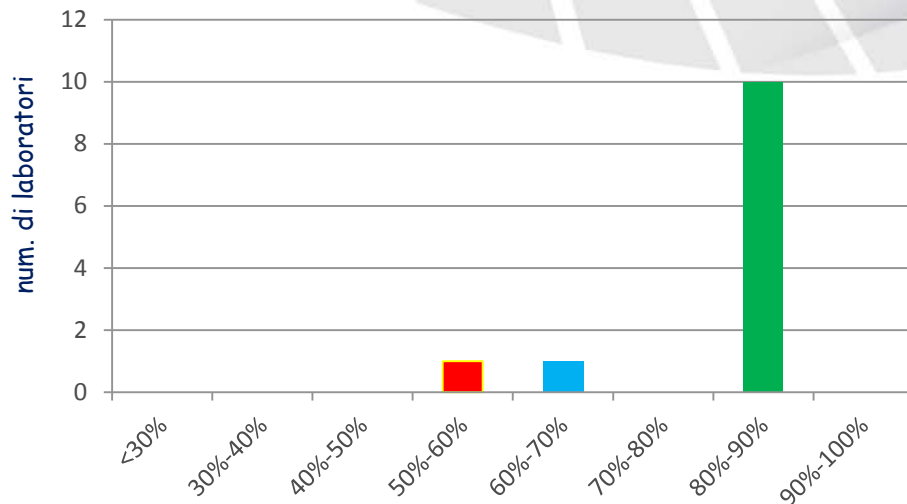
Risultati



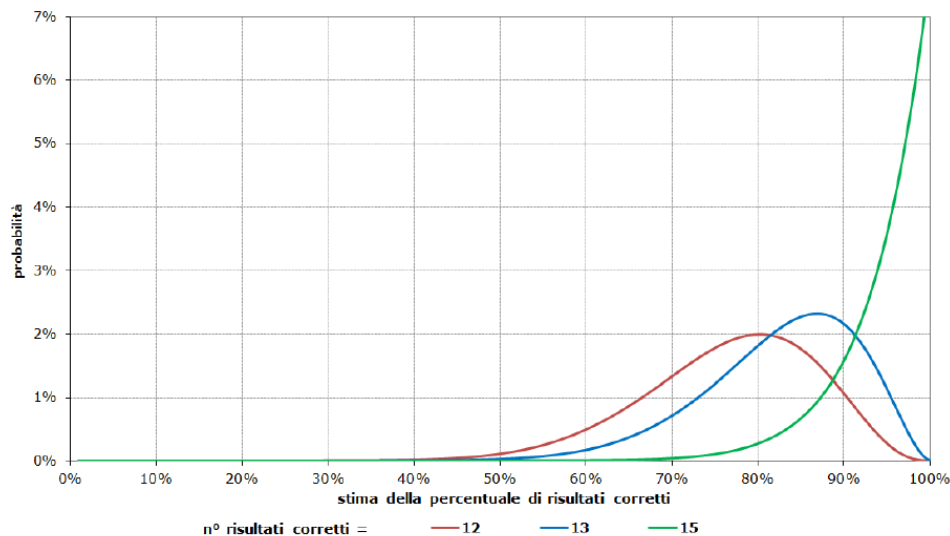
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Identificativo laboratorio	corretti	esaminati	l.c.i. 95%	l.c.s. 95%
659	15	15	82,9%	100,0%
660	15	15	82,9%	100,0%
711	15	15	82,9%	100,0%
712	12	15	54,4%	92,7%
713	15	15	82,9%	100,0%
715	15	15	82,9%	100,0%
716	15	15	82,9%	100,0%
732	13	15	61,7%	96,0%
737	15	15	82,9%	100,0%
738	15	15	82,9%	100,0%
766	15	15	82,9%	100,0%
848	15	15	82,9%	100,0%



Stima della % minima dei risultati corretti



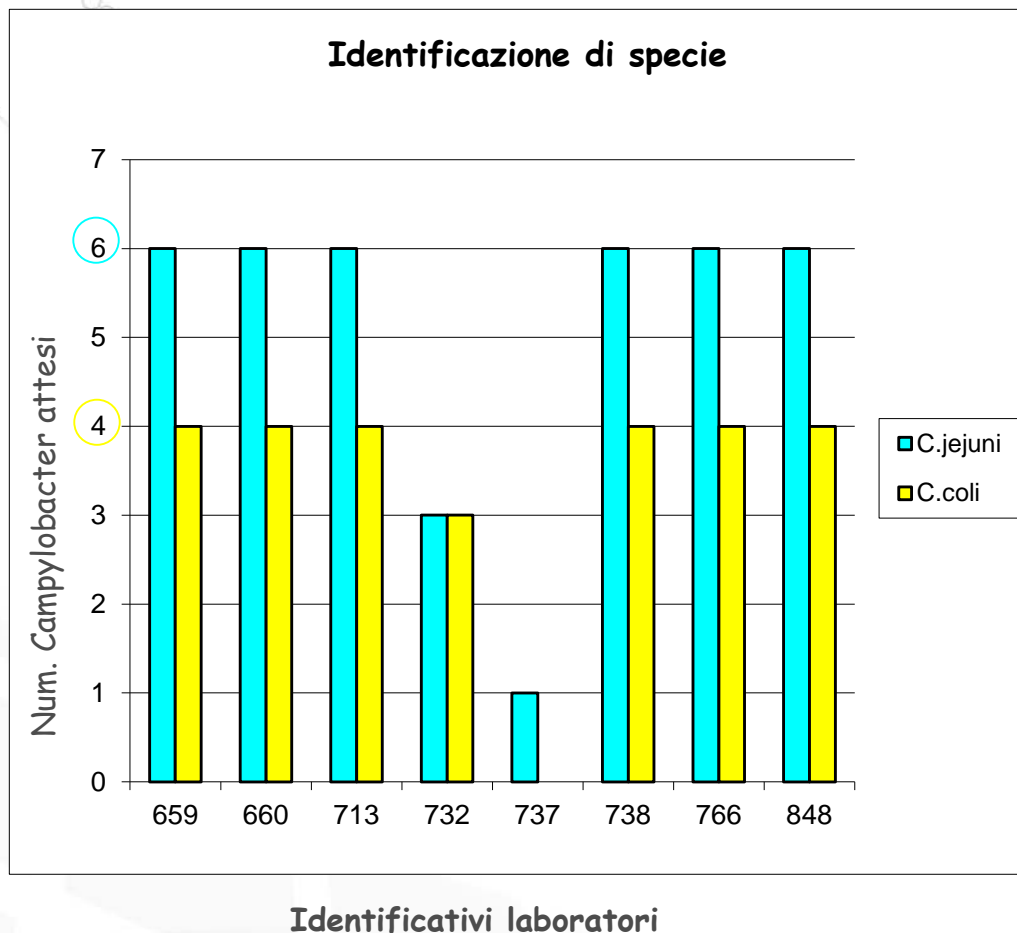
Stima della probabilità di ottenere risultati corretti



Risultati

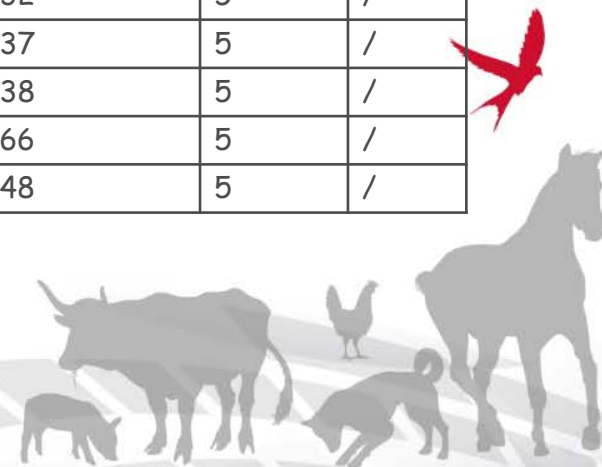


 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Risultato dell'esame dei
5 campioni **negativi**
inviati ai laboratori

Identificativo laboratorio	corretti	errati
659	5	/
660	5	/
711	5	/
712	5	/
713	5	/
715	5	/
716	5	/
732	5	/
737	5	/
738	5	/
766	5	/
848	5	/

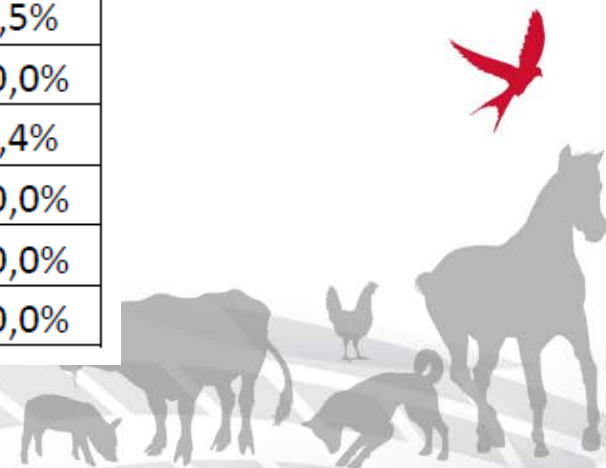




 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Rifer

Risultati cumulati

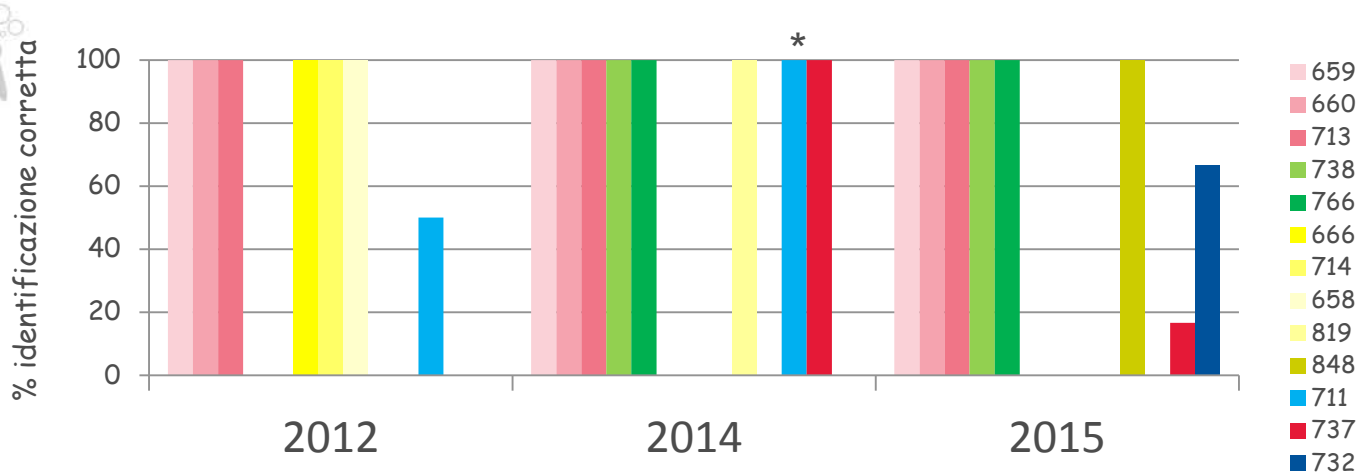
Identificativo laboratorio	corretti	esaminati	I.c.i. 95%	I.c.s. 95%
659	69	69	95,8%	100,0%
660	69	69	95,8%	100,0%
663	39	42	80,9%	97,4%
711	57	57	95,0%	100,0%
712	38	42	77,9%	96,1%
713	57	57	95,0%	100,0%
714	27	30	74,2%	96,4%
715	15	15	82,9%	100,0%
716	53	57	83,3%	97,1%
732	40	42	84,2%	98,5%
737	42	42	93,3%	100,0%
738	41	42	87,7%	99,4%
766	42	42	93,3%	100,0%
819	15	15	82,9%	100,0%
848	15	15	82,9%	100,0%



Risultati cumulati per l'identificazione di specie

 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

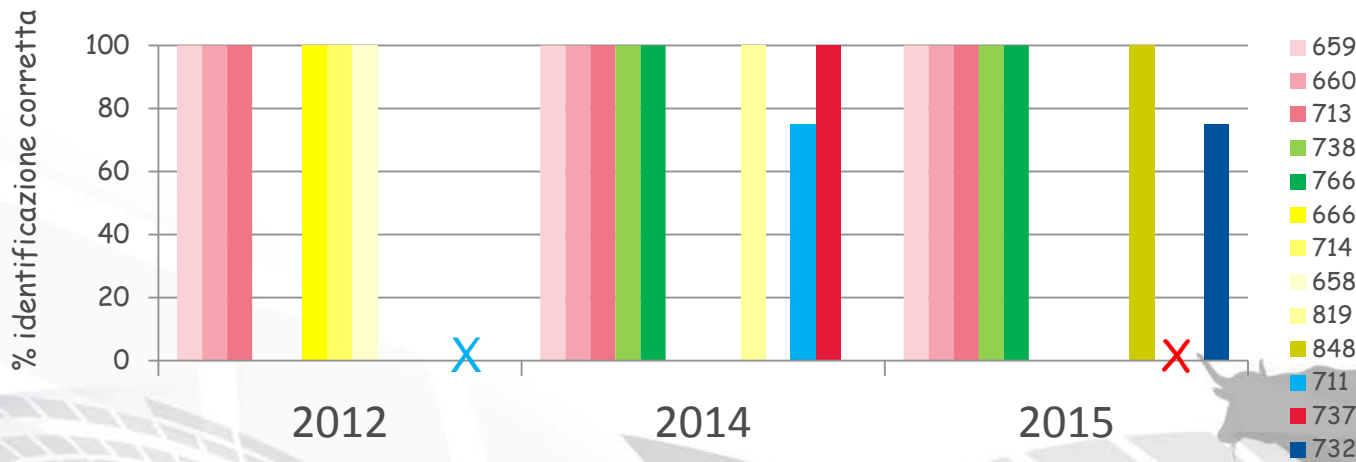
RT-Alimenti: 13 laboratori partecipanti



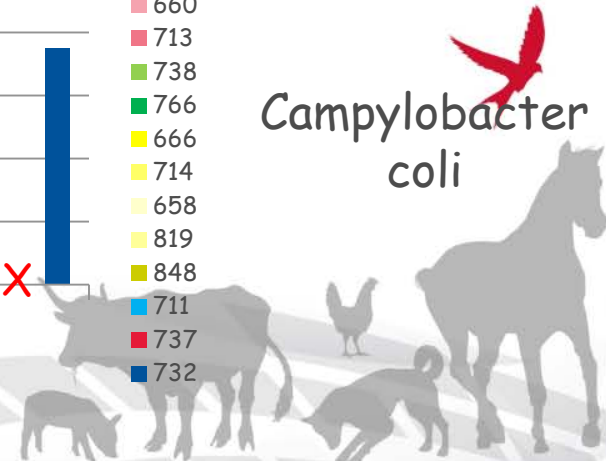
Campylobacter jejuni



*= falso positivo




Campylobacter coli





 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Conclusioni



**Esame qualitativo
(presenza/assenza di
Campylobacter spp)**

83,3% (10/12 lab partecipanti) ha individuato correttamente tutti i 15 campioni;

Tutti i lab hanno identificato correttamente i campioni negativi.

**Esame qualitativo
(identificazione di specie-opzionale)**

66,6% (6/8 lab partecipanti) ha identificato tutte le specie.



Distribuzione 05-2015- Campylobacter Diagnostica





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Al circuito hanno partecipato 17 laboratori,
contrassegnati da codici numerici univoci

Ogni laboratorio ha ricevuto un set di
15 campioni di feci bovine:

- 5 negativi (*E.coli* e *S.aureus*)
- 10 positivi (6 *C.jejuni* e 4 *C.coli*)

10⁸ 10⁹ UFC/ml



Tutti i laboratori hanno inserito i risultati entro la data prevista di chiusura del circuito



Campylobacter
Laboratorio di Diagnostica e Prevenzione

Valutazione della **STABILITA'**

Valutazione della **OMOGENEITA'**

Analisi di 3 campioni ai tempi t_0, t_1, t_2, t_3, t_4 e t_5 per un tot. di 18 campioni per ciascuna delle 2 specie di *Campylobacter*.

I lotti sono risultati stabili e omogenei per l'intero periodo considerato

In tutti gli istanti, per tutte le ripetizioni è stata rilevata la presenza di

Tabella II. Stabilità e omogeneità *Campylobacter jejuni*

Tempo	Risultato 1	Risultato 2	Risultato 3
0	POS	POS	POS
1	POS	POS	POS
2	POS	POS	POS
3	POS	POS	POS
4	POS	POS	POS
5	POS	POS	POS

Campylobacter jejuni

$3,36 \times 10^6 \leq \text{UFC} \leq 1,22 \times 10^9$

Tabella I. Stabilità e omogeneità *Campylobacter Coli*

Tempo	Risultato 1	Risultato 2	Risultato 3
0	POS	POS	POS
1	POS	POS	POS
2	POS	POS	POS
3	POS	POS	POS
4	POS	POS	POS
5	POS	POS	POS

Campylobacter coli

$8,27 \times 10^6 \leq \text{UFC} \leq 1,85 \times 10^9$





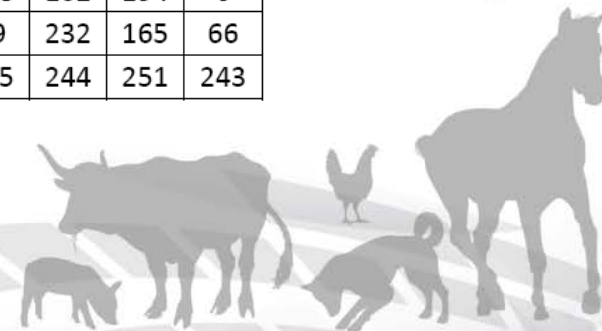
IZSAM
G. CAPORALE
TERAMO

 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Tabella 1. Decodifica campioni



Identificativo laboratorio	Identificativo campione														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
626	207	33	127	32	157	3	74	188	187	70	121	40	222	63	97
627	56	147	174	119	68	130	195	151	137	107	171	84	114	209	197
628	80	132	169	82	92	221	57	113	216	125	219	191	10	19	141
629	95	89	37	145	134	17	199	41	100	43	112	148	28	240	177
630	142	190	239	64	30	118	96	34	24	106	73	108	131	160	189
631	94	11	27	54	135	155	85	26	201	5	168	156	8	192	36
633	159	234	200	53	133	182	50	202	72	143	20	205	23	162	86
637	164	61	214	228	77	163	184	91	7	52	75	117	12	176	60
638	186	99	48	13	126	235	83	88	213	46	215	238	22	175	129
639	44	223	161	65	31	15	154	172	229	218	212	47	14	210	116
643	115	42	104	227	224	180	198	29	87	105	166	173	111	146	179
646	204	236	18	109	149	90	120	196	55	39	25	98	211	110	185
647	69	178	101	206	71	38	78	226	183	237	103	170	136	128	2
651	230	62	58	139	16	140	193	144	138	49	150	93	35	4	203
652	181	45	67	9	122	51	231	123	76	225	124	158	102	194	6
739	167	208	153	220	59	233	21	81	152	1	217	79	232	165	66
741	250	248	246	242	241	254	252	247	253	245	249	255	244	251	243





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

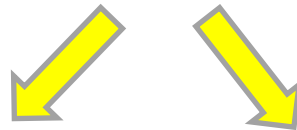
Valutazione statistica dei risultati



Ciascun campione esaminato viene indicato dal laboratorio organizzatore come **errato** o **corretto**.

I risultati delle prove sono stati interpretati come errati o corretti, sulla base della loro corrispondenza ai risultati attesi

È stata quindi stimata la probabilità che il laboratorio fornisca risultati esatti attraverso l'impiego di una distribuzione Beta ($s+1;n-s+1$) con intervallo di confidenza al 95%



s =numero dei risultati corretti forniti da ciascun laboratorio

n =numero dei risultati totali forniti da ciascun laboratorio

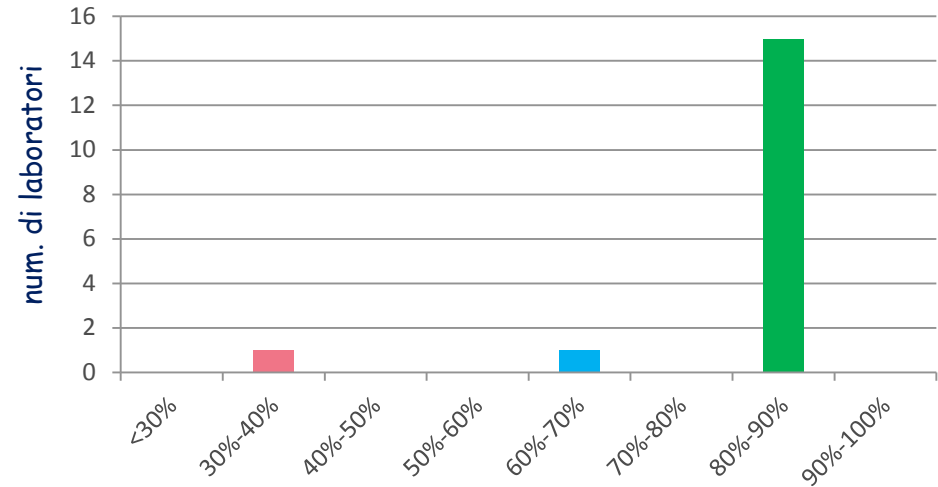


Risultati

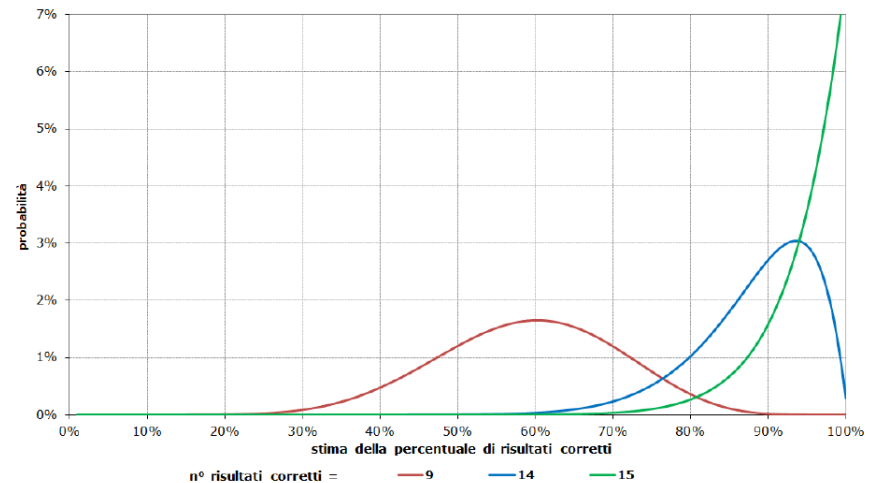


 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Identificativo laboratorio	corretti	esaminati	I.c.i. 95%	I.c.s. 95%
626	15	15	82,9%	100,0%
627	15	15	82,9%	100,0%
628	15	15	82,9%	100,0%
629	15	15	82,9%	100,0%
630	15	15	82,9%	100,0%
631	15	15	82,9%	100,0%
633	15	15	82,9%	100,0%
637	15	15	82,9%	100,0%
638	15	15	82,9%	100,0%
639	15	15	82,9%	100,0%
643	15	15	82,9%	100,0%
646	9	15	35,4%	80,2%
647	15	15	82,9%	100,0%
651	15	15	82,9%	100,0%
652	15	15	82,9%	100,0%
739	15	15	82,9%	100,0%
741	14	15	69,8%	98,4%



Stima della % minima dei risultati corretti



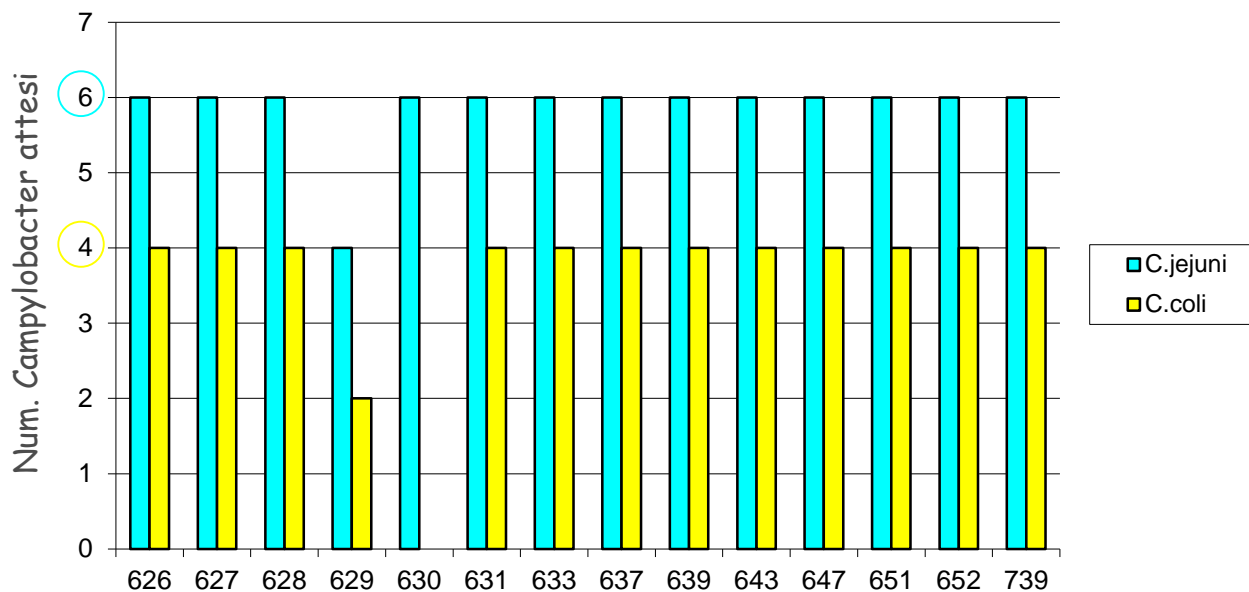
Stima della probabilità di ottenere risultati corretti



Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

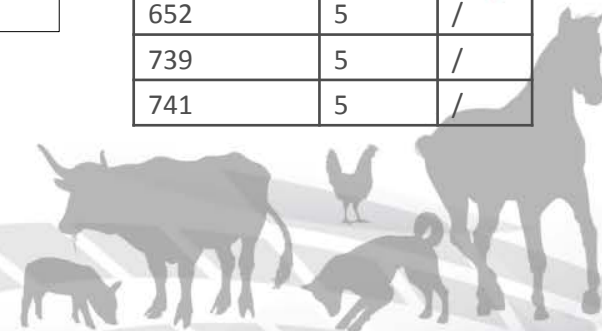
Risultato dell'esame dei 5 campioni **negativi** inviati ai laboratori

Identificazione di specie



Identificativi laboratori

Identificativo laboratorio	corretti	errati
626	5	/
627	5	/
628	5	/
629	5	/
630	5	/
631	5	/
633	5	/
637	5	/
638	5	/
639	5	/
643	5	/
646	5	/
647	5	/
651	5	/
652	5	/
739	5	/
741	5	/





 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Risultati cumulati

Identificativo laboratorio	corretti	esaminati	I.c.i. 95%	I.c.s. 95%
626	69	75	83,6%	96,2%
627	75	75	96,1%	100,0%
628	71	75	87,1%	97,8%
629	73	75	90,8%	99,2%
630	66	75	78,7%	93,5%
631	73	75	90,8%	99,2%
633	75	75	96,1%	100,0%
637	75	75	96,1%	100,0%
638	50	60	71,9%	90,6%
639	71	75	87,1%	97,8%
642	56	60	84,1%	97,3%
643	67	75	80,3%	94,4%
645	41	45	79,2%	96,4%
646	49	60	70,0%	89,4%
647	44	45	88,5%	99,5%
648	60	60	95,2%	100,0%
651	15	15	82,9%	100,0%
652	71	75	87,1%	97,8%
656	45	45	93,7%	100,0%
739	45	45	93,7%	100,0%
741	14	15	69,8%	98,4%



Risultati cumulati per l'identificazione di specie



RT-diagnostica: 25 laboratori partecipanti

C.jejuni

C.coli

 **Campylobacter**
Laboratorio Nazionale di Riferimento

lab	2011	2012	2013	2014	2015
626	100	100	100	100	100
627	100	100	100	100	100
628	100	100	100	100	100
639	100	100	100	100	100
633	100**	100	100	100	100
643	0	75	75	100	100
631	100	0	100	100	100
630	0	0	100***	100	100
637	100	100	100	80	100
629	100*	100	100	100	66.66
642	100	100	100	100	/
648	/	100	100	100	/
739	/	/	100	100	100
641	100	100	100	/	/
645	100	100	/	100	/
652	/	100	100*	100	100
656	/	100	/	100	/
638	/	100	100	/	/
651	/	/	100	/	100
647	/	/	/	100	100
703	/	100	/	/	/
708	/	100	/	/	/
644	100	/	/	/	/
640	100*	/	100*	/	/
646	100***	/	/	/	/

lab	2011	2012	2013	2014	2015
626	75	100	100	100	100
627	100	100	100	100	100
628	75	100	100	100	100
639	100	100	100	100	100
633	100*	100	100	100	100
643	100**	100	100	20	100
631	100	0	75	100	100
630	0	0	25	100	0
637	100*	100	100	100	100
629	100*	100	100	100	50
642	100	100	100	100	/
648	/	100	100	100	/
739	/	/	50	100	100
641	100	100	100*	/	/
645	100***	100	/	100**	/
652	/	33.33	50	100	100
656	/	100	/	100	/
638	/	0	100	/	/
651	/	/	100	/	100
647	/	/	/	100	100
703	/	75	/	/	/
708	/	100	/	/	/
644	100	/	/	/	/
640	75	/	75	/	/
646	0	/	/	/	/




*= falso positivo



 *Campylobacter*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Conclusioni



Esame qualitativo
(presenza/assenza di
Campylobacter spp)

Esame qualitativo
(identificazione di specie
-opzionale)

88% (15/17 lab partecipanti) ha
individuato correttamente tutti i 15
campioni;

tutti i lab hanno identificato
correttamente tutti i campioni negativi.

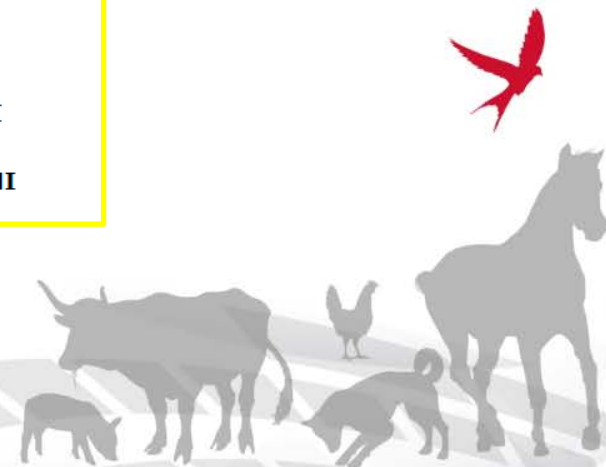
85,7% (12/14 lab partecipanti) ha
identificato correttamente tutte le
specie



Problemi/Proposte: inserimento di un menù a tendina

campione	ID originale	Risultato (labor.)	Identificazione (labor.)	Risultato (atteso)	Identificazione (atteso)
n. 4	n. 10	Presente	SPP (ANCHE PCR)	PRESENTE	C.JEJUNI
n. 19	n. 15	Assente	(ANCHE PCR)	ASSENTE	
n. 28	n. 6	Presente	JEJUNI (ANCHE PCR)	PRESENTE	C.JEJUNI
n. 55	n. 14	Presente	SPP (ANCHE PCR)	PRESENTE	C.COLI

campione	ID originale	Risultati (labor.)	Identificazione (labor.)	Risultati (atteso)	Identificazione (atteso)
n. 24	n. 9	Assente	//	ASSENTE	
n. 30	n. 5	Assente	//	ASSENTE	
n. 34	n. 8	Presente	GEN. CAMPYLOBACTER	PRESENTE	C.COLI
n. 64	n. 4	Presente	C. JEJUNI	PRESENTE	C.JEJUNI



Programmazione per il 2016

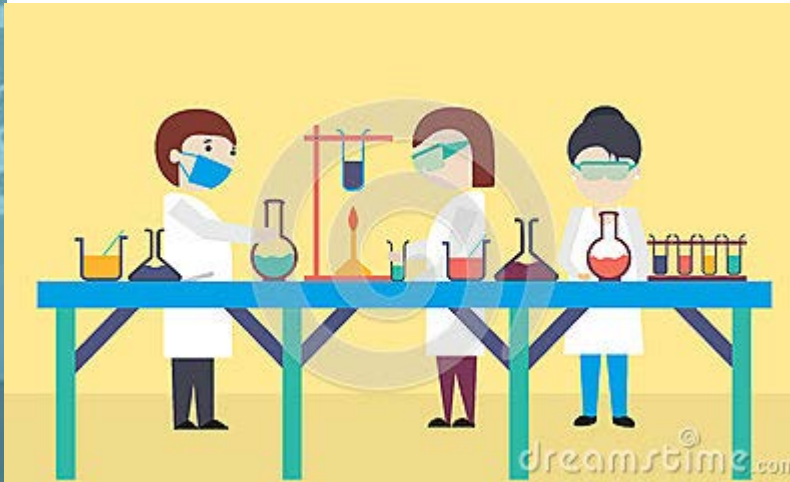
Aprile 2016: Circuito inter-laboratorio *Campylobacter* **Diagnostica**
(ricerca)



Maggio 2016: Circuito inter-laboratorio *Campylobacter* **Alimenti**
(ricerca & numerazione)



GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Dott.ssa **Elisabetta Di Giannatale**

Katuscia Zilli
Giuliano Garofolo
Ilenia Platone
Alessandra Alessiani
Romina Romantini
Lorena Sacchini
Gabriella Di Serafino
Tiziana Persiani
Anna Abbass
Silvana Salvatore
Anita Ferrara
.....E tutti i volontari
del reparto!!!!

