IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Ring Test e problematiche connesse ai laboratori :discussione aperta

Teramo 3 luglio 2019

E.Di Giannatale

Ring Test 2018

- Campylobacter alimenti

Ricerca di Campylobacter in campioni di latte crudo

(10 ml e 25 ml)

- Campylobacter Diagnostica

Ricerca di Campylobacter da feci

- Discussione generale su problematiche di laboratorio

Perché RT sul latte con differenti volumi

- ISO 10272:2017 al punto 9.1 :»ricerca di *Campylobacter* spp. in campioni di 10 g/ml di alimento». La norma, è stata validata per campioni di peso ≤ 10g/ml ……
- In Italia il problema si pone per la ricerca di *Campylobacter* spp., nel latte crudo, erogato con macchine erogatrici, poichè, l'Intesa Stato-Regioni in merito alla "vendita di latte crudo per l'alimentazione umana," del 25/01/2007 (GU13/02/2007) prevede la ricerca del microrganismo (criteri igiene di processo) in 25 ml di prodotto.

Struttura della prova

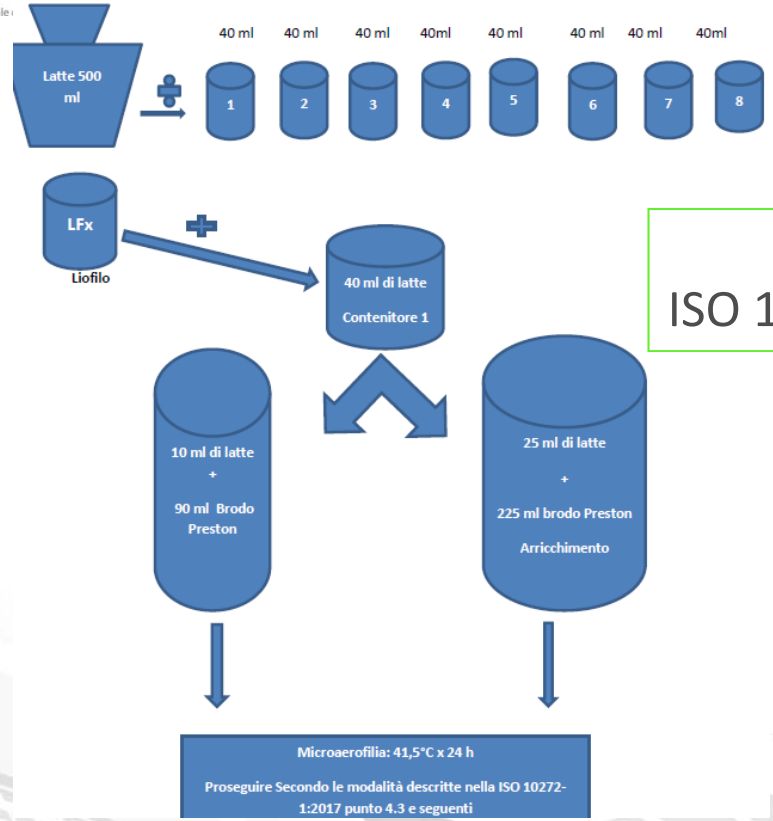
a) Abbiamo effettuato la ricerca del patogeno in campioni di latte crudo artificialmente contaminato, esaminando in parallelo due aliquote di uno stesso campione, da 25 ml e 10 ml. Al circuito hanno partecipato 14 laboratori

Ad ogni laboratorio è stato inviato latte crudo e **un set di 8 liofili** così composti:

- ✓ 3 liofili di latte contenente ognuno *C.jejuni* ATCC 33291 a carica bassa in modo da ottenere dopo ricostituzione in 40 ml di latte 20-70 ufc/ml ;
- ✓ 3 campioni di liofilo contenenti ognuno *C.jejuni* ATCC 33291 a carica media in modo da ottenere dopo ricostituzione in 40 ml di latte 500-700 ufc/ml;
- ✓ 2 campioni di liofilo negativi per *Campylobacter* spp, ma contenenti germi contaminanti (E.coli 1000 ufc/ml) .

+ campione di appoggio per misurare la temperatura all'arrivo (glicole).

Preparazione del campione /Metodo di prova



Ogni liofilo contrassegnato con numero identificativo, ricostituito con 1-2 ml di latte prelevato dalla corrispondente provetta) , 10 minuti di agitazione)

ISO 10272-1:2017 (B)

Valutazione statistica dei risultati

- Ciascun campione esaminato, è stato valutato come errato o corretto dal laboratorio organizzatore, sulla base dei risultati attesi. E' stata quindi stimata la probabilità che il laboratorio fornisca risultati esatti attraverso l'impiego della distribuzione Beta (s+1; n-s+1):

dove

s = numero di risultati corretti forniti da ciascun laboratorio

n = numero di risultati totali forniti da ciascun laboratorio

- E' stata inoltre valutata la concordanza tra i risultati ottenuti dai 14 laboratori partecipanti rispetto alle due tipologie di campione (10 ml e 25 ml). La stima della concordanza è stata calcolata con la k di Cohen.

Valutazione statistica dei risultati

IZSAM G.CAPORALE TERAMO
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferim

Indice «Kappa» di Cohen

		Test A +	Test A -	
Test B	+	42	0	42
	-	0	42	42
		42	42	84

Concordanza complessiva	1,000
Kappa di Cohen	1,000

Interpretazione

Kappa	Concordanza
< 0.01	nulla
0.01-0.20	scarsa
0.21-0.40	modesta
0.41-0.60	moderata
0.61-0.80	buona
0.81-1.00	eccellente

Tabella 1: concordanza dei campioni e stima delle percentuali minime di risultati corretti

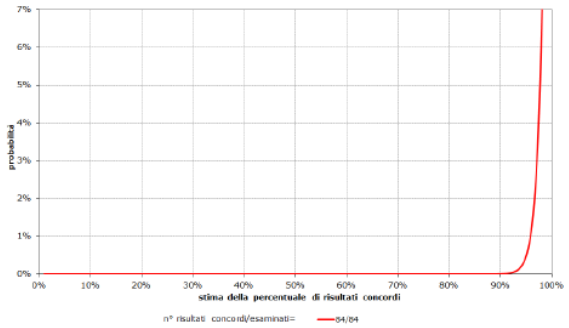
Tipologia di campione	Esaminati	positivi in 10 ml	positivi in 25 ml	Stima delle percentuale minima di risultati concordi (l.c.i. 95%)
Totale positivi	84	84	84	96,50%
Alta carica	42	42	42	93,30%
Bassa carica	42	42	42	93,30%

Risultati singoli laboratori

Tabella 2: Analisi dei risultati ottenuti dai singoli laboratori - ISOLAMENTO

Identificativo laboratorio	campioni esaminati	campioni corretti ricerca 10 ml	campioni corretti ricerca 25 ml
664	8	8	8
713	8	8	8
714	8	8	8
715	8	8	8
716	8	8	8
766	8	8	8
848	8	8	8
862	8	8	8
865	8	8	8
986	8	8	8
987	8	8	8
988	8	8	8
989	8	8	8
990	8	8	8

Grafico1: Stima della percentuale di risultati postivi concordi



Valutazione complessiva

	Campione Negativo	Campione Carica L1	Campione Carica L2
N° Laboratori partecipanti	14	42	42
N° campioni per laboratorio	2	3	3
N° laboratori che hanno inviato i risultati	14	14	14
N° totale risultati considerati	28	42	42
Quantità esaminata	25 ml	25 ml	25 ml
Sensibilità	-	100%	100%
Specificità	100%	-	-

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Stabili e omogenei

Grafico I: Stabilità lotto bassa carica

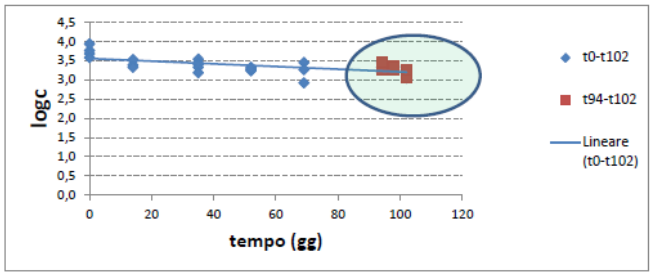


Grafico II: Stabilità lotto alta carica

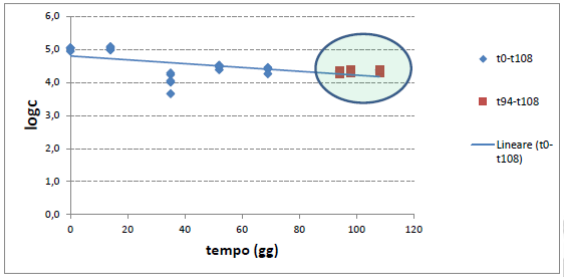


Tabella II: Omogeneità lotto bassa carica

	t_0	t_{14}	t_{35}	t_{52}	t_{69}	t_{94}	t_{98}	t_{102}
media	3,73	3,43	3,37	3,27	3,21	3,34	3,31	3,18
dev.st	0,15	0,10	0,13	0,04	0,27	0,10	0,05	0,12
min	3,57	3,32	3,18	3,23	2,91	3,26	3,26	3,04
max	3,93	3,52	3,53	3,32	3,45	3,45	3,34	3,26

CV	4%	3%	4%	1%	8%	3%	1%	4%
T2	0,02	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,00	0,01
variation between samples	0,006	0,003	0,005	0,000	0,011	0,002	0,000	0,003

Tabella IV: Omogeneità lotto alta carica

	t_0	t_{14}	t_{35}	t_{52}	t_{69}	t_{94}	t_{98}	t_{108}
media	5,02	5,02	4,04	4,46	4,37	4,30	4,32	4,35
dev.st	0,05	0,04	0,25	0,06	0,10	0,04	0,04	0,04
min	4,94	4,98	3,65	4,38	4,26	4,26	4,28	4,30
max	5,04	5,08	4,28	4,52	4,45	4,34	4,36	4,38

CV	1%	1%	6%	1%	2%	1%	1%	1%
T2	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
variation between samples	0,001	0,000	0,013	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000
g.d.l	3	3	4	3	4	3	4	3

RT Campylobacter Diagnostica

- Aprile 2018 (codice 08-2018), per la ricerca di *Campylobacter* spp. da feci bovine.
- I campioni sono stati inviati in data 08/05/2018 ed il circuito è stato chiuso in data 19 giugno 2018.
- Ogni laboratorio ha ricevuto un set costituito da 15 campioni.
- Al circuito hanno partecipato 17 laboratori;
- 1 solo laboratorio non ha inserito i risultati alla data prestabilita

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

- ✓ **Omogeneità: 0**, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 giorni. Per ogni intervallo di tempo sono stati esaminati 3 campioni per un totale di 21 campioni per ciascuna delle 3 specie di *Campylobacter* utilizzati per la contaminazione . Il primo intervallo, T0, è stato analizzato prima della refrigerazione a 4°C, i restanti giornalmente durante la refrigerazione .
- ✓ La **stabilità**, dei campioni, è stata determinata esaminando tre campioni ai seguenti intervalli di tempo: 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 giorni per un totale di 21 campioni per ciascuna delle 3 specie di Campylobacter (jejuni, fetus e coli). Il primo intervallo T0 è stato analizzato prima della refrigerazione a 4°C, i restanti giornalmente durante la refrigerazione .

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

Stabili e omogenei

- ✓ **C.jejuni:** In tutti gli istanti di tempo e per tutte le ripetizioni è stata rilevata la presenza di *Campylobacter* con una carica compresa tra un minimo di 2.2*10E5 e un massimo di 1.8*10E6 **.**

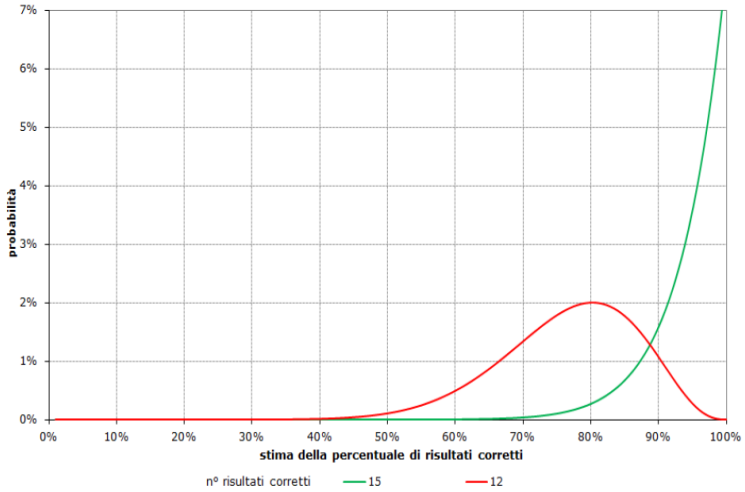
- ✓ **C.coli**: In tutti gli istanti di tempo e per tutte le ripetizioni è stata rilevata la presenza di *Campylobacter* con una carica compresa tra un minimo di 6.1*10E6 e un massimo di 1.5*10E7
- ✓ **C.fetus:** In tutti gli istanti di tempo e per tutte le ripetizioni è stata rilevata la presenza di *Campylobacter* con una carica compresa tra un minimo di 1,9*10 E6 e un massimo di 2,3*10 E8

Risultati

Stima della percentuale di risultati corretti

Identificativo laboratorio	corretti	esaminati	l.c.i. 95%	l.c.s. 95%
627	15	15	82,93%	100%
628	15	15	82,93%	100%
630	15	15	82,93%	100%
631	15	15	82,93%	100%
633	15	15	82,93%	100%
637	12	15	54,35%	92,73%
639	15	15	82,93%	100%
642	15	15	82,93%	100%
645	15	15	82,93%	100%
646	15	15	82,93%	100%
647	15	15	82,93%	100%
648	15	15	82,93%	100%
650	15	15	82,93%	100%
652	15	15	82,93%	100%
656	15	15	82,93%	100%
739	15	15	82,93%	100%

Grafico 1: Distribuzioni delle percentuali di risultati corretti per la ricerca di *Campylobacter* spp.



Identificazione di specie (opzionale)

Tabella 4. Risultati identificazione di specie.

Identificativo laboratorio	*Campylobacter coli*	*Campylobacter fetus*	*Campylobacter jejuni*
628	3	3	4
631	3	3	4
633	3	3	4
639	3	3	4
642	3	3	4
647	3	3	4
652	3	3	4
739	3	3	4

IZSAM G.CAPORALE TERAMO
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

conclusione

a) 15/16 laboratori (93,75%) partecipanti hanno individuato correttamente tutti i campioni, indicando la presenza/assenza di *Campylobacter* spp.
b) Un laboratorio ha classificato erroneamente 3/15 campioni.
c) L'identificazione di specie, opzionale, è stata effettuata da 8 laboratori e tutti hanno identificato correttamente tutti i 10 campioni positivi (3 *Campylobacter Coli*, 3 *Campylobacter Fetus* e 4 *Campylobacter Jejuni*).

Discussione aperta