Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Validazione del metodo interno CRENM/01

Ricerca nel latte di agenti responsabili di mastiti

mediante metodo colturale

(MI CRENMOC/01 2009 Rev.00).

Il presente studio di validazione è stato conseguito con il progetto di ricerca corrente IZSSA 07/2011 RC – "Diagnosi di Infezione Intramammaria: Valutazione del Contributo Dato dal Metodo Microbiologico", responsabile Dr. S. Lollai.
Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali – Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti.

INTRODUZIONE

I metodi della microbiologia diagnostica, in genere derivanti da consuetudine o da "scuola" microbiologica, non sono sempre codificati da norme e le loro prestazioni ed efficacia diagnostica non sono sempre noti.

Lo studio e l'ottimizzazione delle loro caratteristiche e performance sono perciò importanti, anche in funzione dell'accreditamento delle prove secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.

La validazione consiste non solo nel valutare la capacità di un metodo di individuare correttamente l'agente eziologico ma anche, per i metodi diagnostici, nella verifica della capacità di fornire possibilmente informazioni sullo stato di malattia del soggetto in esame. Il progetto si proponeva di determinare la validità ed il contributo dato dall'esame colturale microbiologico alla diagnosi di infezione intramammaria.

La validazione dei metodi non normalizzati in uso nei laboratori di prova è prescritta dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 (Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura) che con validazione intende lo studio delle prestazioni legate allo scopo che il metodo deve assolvere. La definizione operativa di validazione data dall'OIE, Organizzazione Mondiale della Sanità Animale, ("processo al fine di determinare la validità [di un metodo] per un particolare scopo") richiama la dipendenza della validazione dal background clinico ed epidemiologico della popolazione in esame (25).

Il metodo di prova oggetto di studio è il metodo normalmente impiegato nei laboratori dell'IZS Sardegna / CReNMOC per la ricerca colturale dei patogeni mastitici in campioni di latte ovi-caprino.

Il progetto prevedeva che campioni di latte prelevati da capi affetti da mastite e sani, venissero esaminati per la ricerca di patogeni e degli indici di infiammazione della mammella, quali il contenuto di cellule somatiche, aspetti clinici e altri indici chimico-fisici e igienico-sanitari e che il risultato dell'esame microbiologico venisse raffrontato con un *pool* di detti parametri scelto quale indice convenzionale di mastite e riferimento di confronto per stabilire la validità dell'esame microbiologico. Per microrganismi di origine ambientale prevedeva inoltre la ricerca di un valore soglia microbiologico per discriminare i risultati veri positivi, la stima dei valori predittivi, dei likelihood ratio e delle probabilità pre- e post-test secondo Fagan (24) per stabilire il contributo dato alla diagnosi di mastite.

La correlazione tra risultato colturale e altri indici di infezione mammaria è stata in genere cercata affidandosi a risultati colturali solo qualitativi, di presenza/assenza. Il progetto si è proposto di ricorrere anche a tecniche colturali quantitative in grado di aumentare il *recovery* dei microrganismi dal campione per evitare di sottostimare i positivi a bassa carica.

La ricerca è stata rivolta principalmente agli stafilococchi coagulasi negativi (CNS), batteri responsabili di mastiti subcliniche e perciò di difficile diagnosi. Si tratta di agenti di frequente riscontro che si trovano normalmente

nell'ambiente e sulla cute del capezzolo e che colonizzano i tessuti mammari con relativa facilità (9).
In mancanza di un *golden standard* sicuro, le prestazioni del metodo microbiologico sono state valutate per confronto con un modello convenzionale costituito da un *pool* di *marker* chimico-clinici indicativi di mastite, relativi al campione/capo di provenienza e scelti come riferimento.
I parametri analitici del metodo, elencati nel seguito, sono stati valutati al fine di stimarne il contributo diagnostico ed i possibili miglioramenti da apportare.
Ricerca dei valori soglia. La presenza di stafilococchi coagulasi negativi in campioni di latte può essere occasionale e non legata allo stato di malattia. Rappresentano quindi una sorta di "*rumore di fondo*" batterico spesso presente nei campioni. Per tale motivo il metodo diagnostico atto a rilevarli deve definire un valore-soglia, espresso in numero di colonie, al di sotto del quale il campione dovrà essere considerato negativo (1). Ciò è importante anche al fine di ottimizzare le stime sulla prevalenza di mastiti in una popolazione animale, spesso fatte proprio sulla base dei risultati colturali. Errori di estrapolazione possono infatti dipendere dall'uso di *cut off* non sufficientemente validati (1). Pur essendo l'esame colturale una prova a risposta dicotomica del tipo positivo/negativo, risulta utile stabilire tra i due tipi di risultati. una soglia di discrimine, espressa in numero di colonie.
Limite di rilevazione (Limit of Detection, LOD). Prove microbiologiche qualitative possono produrre risultati negativi anche se in presenza del microrganismo nel campione. Il *recupero* del patogeno dipende infatti dalla sua concentrazione e la caratterizzazione di un metodo microbiologico non può prescindere dalla stima del recupero. Nei metodi qualitativi il recupero viene espresso come LOD, inteso come la più piccola concentrazione di analita alla quale la prova risulta positiva in una data percentuale di casi (8.26). E' in genere conveniente stimare il LOD50, ovvero la concentrazione minima di microrganismo alla quale nel 50% dei casi il campione risulta negativo pur contenendo l'analita. Tale parametro viene usato in campo microbiologico come *endpoint* di stima di basse cariche ed è stato proposto, assieme al suo intervallo di confidenza, come indice di incertezza di misura dei metodi qualitativi. Rappresenta quindi un importante indicatore dell'efficacia diagnostica di un metodo (26). LOD relativi ad altre concentrazioni di analita possono comunque essere calcolati.
Altri parametri analitici del metodo colturale sono stati inoltre stimati al fine di completare il quadro della sua efficacia diagnostica: sensibilità, specificità, accuratezza, (5), valori predittivi, likelihood ratio, probabilità pre- e post-test, analisi ROC (23, 24), stimati sempre per confronto con il riferimento adottato costruito sulla base dei test chimico-fisici e igienico-sanitari. Oltre a questi, portati avanti dal Laboratorio di Batteriologia Speciale dell'IZS Sardegna, come Single Laboratory Validation, il progetto prevedeva anche uno trial collaborativo interlaboratorio sulla concordanza del risultato realizzato in collaborazione con i laboratori di microbiologia diagnostica dell'IZS Sardegna.

Il progetto si è svolto secondo più fasi, quali la definizione del disegno sperimentale, l'individuazione dei parametri da determinare e del *golden standard* di confronto, seguite dalle sessioni analitiche per la stima dei parametri diagnostici. Quindi analisi dei campioni, studio microbiologico collaborativo ed elaborazione dei risultati. La fase di studio analitico del metodo e del confronto con il riferimento chimico-clinico adottato hanno rappresentato il momento più impegnativo ed importante per le acquisizioni discusse nella presente relazione.
Lo studio effettuato risulta inoltre utile per della validazione del metodo secondo la UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.

MATERIALI E METODI

Animali

La ricerca è stata eseguita, su ovini di razza sarda provenienti da 13 allevamenti diversi.

Prelievo dei campioni

Dopo aver disinfettato accuratamente i capezzoli con prodotti a base di cloro e sostanze emollienti ed aver eliminato i primi getti di latte da entrambi i capezzoli all'interno di un contenitore, il latte delle due emimammelle è stato raccolto separatamente in contenitori sterili con tappo a vite da 50 ml, contrassegnati con il codice identificativo dell'animale.
I campioni di latte così prelevati sono stati conservati e trasportati a temperatura di refrigerazione (4 ± 2 °C) ai laboratori dell'IZS della Sardegna, ente accreditato secondo la norma UNI EN ISO/IEC 17025 per gli esami chimico-clinici e batteriologici.
Sono stati esaminati n. 685 campioni totali.

Analisi dei campioni

Sui campioni di latte sono state effettuate le seguenti prove: esame colturale quantitativo e qualitativo (metodo CReNMOC001), test per studio analitico del metodo (UO n.1); contenuto in cellule somatiche, grasso, proteine, lattosio, urea, caseine e pH; esami colturali qualitativi.

<u>Esame colturale convenzionale (qualitativo)</u>
E' stato eseguito secondo il metodo standardizzato impiegato presso l'IZS Sardegna per la ricerca dei patogeni mammari, metodo CReNMOC01, rev. 00 del 19.10.2009. Dieci microlitri di latte ovino, sono stati inoculati per isolamento con un'ansa da batteriologia su piastre di agar sangue ovino. Le piastre incubate in aerobiosi a 37 °C ed esaminate per la positività dopo 48 h. Si è quindi proceduto all'identificazione degli isolati con metodi convenzionali e, se necessario, biomolecolari (18).

Esame colturale quantitativo. Conteggio delle colonie

Con una micropipetta sono stati inoculati 100 µl di sospensione su piastre di agar AS/TSA, in più replicati e fino a 1 ml di inoculo totale al fine di aumentare il recupero in caso di bassa carica microbica. L'inoculo è stato distribuito con una bacchettina sterile sulla superficie dell'agar fino a completo assorbimento. Per una maggiore precisione del conteggio, il campione è stato preventivamente agitato per almeno 25 volte, capovolgendo rapidamente il contenitore, in modo da rendere omogenea la distribuzione dei microrganismi, evitando la formazione di schiuma o permettendo a questa di dissolversi prima di inoculare. L'intervallo di tempo tra l'agitazione ed il prelievo per l'inoculo non è mai stato superiore ai 3 min. La pipetta è stata introdotta per non più di 1 cm all'interno della sospensione ed il puntale strisciato contro il bordo interno della provetta in modo da depositarvi l'eccesso di liquido adeso. Prima dell'uso, le piastre erano state messe preventivamente ad asciugare sotto cappa o in termostato Dopo l'inoculo le piastre sono state incubate rovesciate a 37 °C per 48 h, in aerobiosi, disposte a caso, in pile di massimo 6 (e possibilmente meno) e distanti non meno di 2,5 cm l'una dall'altra e dalle pareti dell'incubatore (10, 11, 12, 13).
Campioni con altri patogeni non sono stati inclusi nello studio.

Determinazione del contenuto in cellule somatiche nel latte

La determinazione del contenuto in cellule somatiche del latte è stata effettuata attraverso il metodo fluoro-opto-elettronico con apparecchiatura automatizzata (FOSSOMATIC FC) secondo la norma UNI EN ISO 13366-2:2007 *Conta delle cellule somatiche – Parte 2: Guida sulle condizioni operative dei contatori fluoro-opto-elettronici*.

Determinazione del contenuto in grasso, proteine, lattosio, urea e caseine

La determinazione del contenuto in grasso, proteine, lattosio, urea e caseine è stata effettuata mediante spettrofotometria nel medio infrarosso a trasformata di Fourier con apparecchiatura automatizzata (Milkoscan FT 6000) secondo la norma *FIL-IDF 141C:2000 Determination of milkfat, protein and lactose content – Guidance on the operation of mid-infrared instruments*.

Determinazione del pH

La determinazione del pH è stata effettuata con metodo potenziometrico attraverso l'utilizzo di un pH-metro con elettrodo combinato con termosonda secondo la norma *ISO 7238:2004 – IDF 104:2004 Butter – Determination of pH the serum – Potentiometric method.*

Scelta del riferimento convenzionale indice di mastite

Al fine di costruire un “modello convenzionale di riferimento” indicativo di mastite, cui confrontare i risultati degli esami batteriologici, sono stati presi in considerazione i risultati di test chimico-clinici eseguiti sugli stessi campioni.
Test basati quindi su principi fisio-patologici diversi e perciò ritenuti sufficientemente “indipendenti” dall’esame batteriologico. Condizione, questa, necessaria per fare in modo che l’informazione aggiunta non sia già in qualche modo “contenuta” nel risultato batteriologico. Tra gli esami chimico-clinici più frequentemente eseguiti, sono stati presi in considerazione quelli più significativamente legati a mastite, quali: la determinazione del contenuto di cellule somatiche nel latte (SCC), indicatore dello stato sanitario e produttivo dell’animale, il contenuto di lattosio (soglia < 4,0 g/100 g) ed il contenuto di caseina (soglia < 4,5 g/100 g). Per le elaborazioni sono stati considerati in genere 3 livelli SCC: > 250000, >500000, > 1000000 cellule/ml.

Limit of detection (LOD)

Preparazione delle sospensioni batteriche

Per la stima del LOD sono stati preparati campioni di latte positivizzati presso il laboratorio UO1 con uno stafilococco di referenza a più livelli di concentrazione, fino a 6. Le sospensioni iniziali sono state preparate in soluzione fisiologica sterile, standardizzate per confronto visivo con lo standard McFarland 0.5 contro un foglio di carta a righe nere, tipo Wickerham (8.21). Da questa sospensione, di concentrazione pari a $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, sono stati prelevati 100 µl e versati in una provetta contenente 9,9 ml di latte (già sottoposto a test di sterilità secondo ISO 16140). Eseguite quindi diluizioni scalari successive in provette mantenute in ghiaccio durante le operazioni e continuamente omogenate con vortex.
Per le determinazioni sono state scelte le sospensioni a concentrazioni tali per cui il livello più alto fornisse replicati tutti positivi ed il più basso tutti negativi. Le sospensioni batteriche di ogni livello di concentrazione sono state quindi inoculate secondo il metodo in CReNMOC001 in più replicati (fino a 40) su piastre di agar ad ampio spettro (agar sangue). Il numero dei replicati è stato scelto in modo da aumentare l’accuratezza e diminuire l’intervallo di confidenza del LOD (26). L’assenza dell’analita nel latte impiegato era stata preliminarmente confermata da 6 colture indipendenti (5). Sono state eseguite 5 sessioni analitiche.

Contenuto microbico delle sospensioni

Il contenuto microbico delle sospensioni è stato stimato sottoponendo a conteggio 3 diluizioni intermedie e inoculando da queste 100 µl in quintuplicato su piastre di agar preventivamente asciugate in termostato. L’inoculo è stato quindi distribuito uniformemente con le apposite bacchette sterili su tutta la superficie dell’agar evitando di toccare i bordi della piastra (10, 11, 12, 13). Le piastre incubate a 37 °C per 24-48 h; contate quindi le colonie (<300 e >10 in accordo a ISO 7218:2013) e calcolata la media delle

colonie, ponderata per inoculo e fattore di diluizione. La concentrazione dei batteri ottenuta è stata espressa in CFU/ml, Unità formanti colonia o Colony Forming Unit.
Tutte le operazioni sono state condotte da un operatore esperto.

Metodo per il calcolo del LOD
Il numero delle colture replicate risultate positive per ogni diluizione è stato registrato. Le percentuali di colture positive messe in rapporto alle concentrazioni di analita in un grafico cartesiano. La spezzata ottenuta è stata interpolata a curva sigmoide (il modello matematico cui ci si rifà è quello delle curve di sopravvivenza) di cui il punto di flesso rappresenta il LOD50. Per facilitare i calcoli, la curva è stata linearizzata secondo il metodo Probit. I dati sono stati quindi trasformati in forma logaritmica e stimata l'ascissa (CFU) corrispondente all'ordinata del LOD50 (26). Per le elaborazioni è stato usato il software StatPlus (AnalystSoft Inc., USA).

Soglia di positività per l'esame colturale
Per quanto detto sopra è stato ritenuto necessario stabilire un valore soglia dell'esame colturale qualitativo, espresso in numero di colonie, al di sotto del quale la prova dovrebbe essere considerata negativa. A tal fine più approcci sperimentali sono stati adottati.

5.1.1.Concordanza tra colonie batteriche (CFU) e riferimento adottato
Una volta stabilito per conteggio il contenuto di batteri presenti nei campioni, come descritto in § 5.3.2., valori-soglia simulati sono stati via via attribuiti ai conteggi e questi conseguentemente classificati come positivi o negativi. Per ogni valore è stata calcolata la concordanza tra il risultato della coltura e il riferimento chimico-clinico adottato, esprimendola come indice K di Cohen. Il valore CFU al quale corrispondeva la massima concordanza è stato ritenuto il valore del *cut off* da assegnare all'esame colturale e discriminante al meglio i risultati positivi dai negativi.

Analisi ROC
Per stabilire la soglia ottimale è stato anche impiegato l'approccio ROC. Importante strumento della teoria delle decisioni, le curve ROC (Receiver Operating Characteristic) sono degli schemi grafici usati per stabilire l'efficacia di "classificatori" binari, come i test diagnostici.
Valori di soglia sono stati attribuiti alla variabile in studio (numero di CFU) in modo sequenziale ed iterativo tramite l'ausilio di software. I risultati CFU sono stati quindi classificati in forma duale (pos/neg), in base ai corrispondenti risultati dello standard chimico-clinico adottato, calcolate per ogni soglia le relative grandezze diagnostiche (sensibilità, specificità etc.). Le coppie di valori Se e Sp (1-Sp per l'esattezza) sono state riportate su assi cartesiani,

tracciata la curva ROC interpolante e individuato il valore con il miglior potere discriminante in grado di ottimizzare i parametri diagnostici.

Ring test

E' stata fatta una prova collaborativa al fine di valutare l'accordanza e la concordanza del metodo CReNMOC01 a varie concentrazioni di microrganismo. Il progetto prevedeva l'invio di campioni negativi, campioni con concentrazione attesa di analita al di sopra del limite di sensibilità del metodo (LOD50 ≈ 67 CFU/ml), campioni con analita almeno 10 volte al di sopra di tale limite (quindi > ≈ 670 CFU/ml).
Per la contaminazione dei campioni di latte è stata dapprima preparata una sospensione di *S. epidermidis* di riferimento alla concentrazione 1 McFarland in soluzione fisiologica sterile. Da questa sospensione sono state preparate diluizioni successive su base 10 in latte fino alla concentrazione di $3 \cdot 10^6$ CFU/ml. Questa sospensione è stata diluita 1:3 ottenendo così una sospensione di $1 \cdot 10^6$. Da questa sono state eseguite 4 diluizioni scalari su base 10 per avere una sospensione di $1 \cdot 10^2$. La sospensione di livello più basso è stata poi ulteriormente diluita 1:2 per avvicinare la concentrazione al valore cercato. Dalle sospensioni sono state preparate aliquote da 1 ml e usate come campioni del RT inviati ai laboratori. Sui campioni ricevuti i laboratori dovevano eseguire 8 replicati per valutare la concordanza del metodo. I risultati sono stati elaborati secondo l'Annex L della ISO 16140. Il contenuto batterico effettivo delle sospensioni indicate come 1 10^3 e 1 10^2, usate per il RT, è stato valutato inoculando 100 µl di ciascuna diluizione in triplicato su piastre di agar ad ampio spettro.

Elaborazione dei dati

I seguenti fogli elettronici e software sono stati impiegati per le elaborazioni: Microsoft Excel 2007, Microsoft, USA; StatPlus, AnalystSoft Inc., USA; XLStat, Addinsoft, USA; Diagnostic test calculator (ver. 2010042101), MedCalc Statistical software. ver. 13.3, . http://www.medcalc.org/index.php; Graphpad Software QuickCalcs ©2014, GraphPad Software, Inc., http://graphpad.com/quickcalcs. I dettagli sulle modalità di elaborazione e dei test statistici impiegati sono indicate nei rispettivi paragrafi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Riferimento clinico-chimico

Come detto sono stati individuati i seguenti parametri chimico-clinici quale riferimento convenzionale: contenuto in cellule somatiche del campione, espresso in cellule/ml, tenore in lattosio (soglia < 4,0 g/100 g), contenuto di caseina (soglia < 4,5 g/100 g). La scelta è stata basata anche sul fatto che i risultati di tali esami, fra tutti gli esami chimico-clinici eseguiti di routine, sono risultati avere, ad una esplorazione preliminare, una indicativa concordanza

col test batteriologico. Un campione è stato quindi ritenuto positivo per mastite se positivo ai 3 test considerati.

Esame colturale qualitativo
Sono risultati positivi per CNS 208 campioni su 581 inclusi nello studio (35,8%), principalmente per *Staphylococcus epidermidis*.

Conteggio delle colonie
Il conteggio delle colonie è stato eseguito su 435 campioni; la media dei conteggi sui positivi all'esame colturale convenzionale è risultata > 1841 CFU/ml, dei negativi 209 CFU/ml. I campioni da capi classificati come "sani" dal modello adottato hanno mostrato una media di 791 CFU /ml (SCC>250000, N=180); i campioni da capi "malati" (sempre secondo il riferimento adottato) una media CFU maggiore di 1893/ml.

Calcolo del LOD
Nelle 5 sessioni analitiche effettuate sono stati ottenuti i seguenti risultati (All. 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6):
Il valore del LOD50 è stato stimato quindi a 67,71 CFU/ml (CI 95%: 30,20-249,22). Il limite di sensibilità risulta più basso del contenuto medio di microrganismi riscontrato in campioni di animali classificati come sani secondo il riferimento adottato.

Calcolo della soglia di positività per l'esame colturale
Nella simulazione del *cut off* con l'approccio basato sulla massima concordanza sono stati ottenuti i risultati riportati nell'allegato 9.7. Il raffronto con il modello di riferimento adottato è stato fatto per SCC>250000, SCC>500000 e SCC>1000000 cell/ml.
Le concordanze massime sono state ottenute in tutti i casi con valori di CFU situati in un intorno di 500 CFU/ml.
La concordanza tra conteggio delle colonie ed il riferimento si colloca quindi nella fascia *fair* della scala di Landis e Koch (vedi All. 9.8).
Per valori SCC>1000000 cell/ml l'indice di concordanza risulta leggermente più elevato avvicinandosi alla fascia *moderate*.
Sulla base di questi risultati, si può comunque trarre l'indicazione che al sotto della 5 colonie (circa) l'esame colturale routinario, che prevede l'inoculo di 10µl di campione, dovrebbe essere considerato negativo.
La ricerca della soglia CFU ottimale è stata effettuata anche con analisi ROC. I conteggi sono stati confrontati con il modello adottato al variare di una soglia CFU via via assegnata. L'elaborazione è stata fatta per 3 diversi livelli di SCC: >250000, >500000 e >1000000 cell/ml. Le curve ottenute sono visibili negli allegati 9.9, 9.10, 9.11.
La miglior soglia discriminante è risultata cadere in un intorno di 520 CFU, collegata ai parametri diagnostici riportati nell'All. 9.12.

I valori di soglia CFU del metodo colturale sono molto simili per tutti i range SCC testati e convergono verso quelli già stimati con l'approccio della massima concordanza.
Il parametro AUC (area under curve, area sottesa alla curva) è un indicatore dell'efficacia diagnostica di un test e può fornire ulteriori indicazioni sul metodo. Tanto più l'AUC è elevata, tanto più un test è efficace nel classificare i risultati. In condizioni di perfetta distinzione, la curva passerebbe per l'angolo superiore sinistro degli assi e la AUC sarebbe uguale a 1, mentre la curva ROC di un test privo di valore diagnostico coincide con la diagonale. L'interpretazione del valore dell'AUC avviene convenzionalmente secondo la seguente scala: AUC = 0,5: test non informativo; AUC compresa tra 0,5 e 0,7: test poco accurato; AUC compresa tra 0,7 e 0,9: test moderatamente accurato; AUC compresa tra 0,9 e 1,0: test altamente accurato.
L'esame batteriologico-colturale quantitativo adottato, secondo le soglie ed il modello stabilito, con valori di AUC intorno a 0,770 si colloca quindi come prova moderatamente accurata.

Parametri diagnostici del metodo colturale convenzionale (metodo CReNMOC001)
La concordanza tra l'esame colturale convenzionale e il modello adottato ha mostrato valori del K di Cohen compresi tra 0,203 0,223 e 0,230 in corrispondenza rispettivamente di SCC > di 250000, 500000 e 1000000 cell/ml, collocandosi nella fascia *fair* della scala di Landis e Koch.
Le sensibilità e specificità stimate sono state rispettivamente 0,75/0,53; 0,78/0,54; 0,80/0,54 e non hanno mostrato variazioni sostanziali al cambiare della soglia SCC del modello adottato. Il metodo risponderebbe meglio nella condizione con SCC>1000000 per la quale un animale ammalato ha probabilità dell'80% di risultare positivo al test, mentre animali sani risultano negativi nel 54% circa dei casi. I valori predittivi mostrano che si ha una probabilità del 34% circa che l'animale risultato positivo sia realmente ammalato e una probabilità del 54% circa che l'animale risultato negativo sia realmente sano. Per le tre fasce di SCC si è provveduto a stimare i rapporti di verosimiglianza (likelihood ratio) e ricavare la cosiddetta probabilità post-test, ovvero il contributo dato dal risultato microbiologico colturale qualitativo al rafforzamento del sospetto diagnostico di mastite.
I risultati sono evidenziati nei nomogrammi di Fagan degli allegati 9.13, 9.14 e 9.15, e mostrano che il contributo dato dal metodo non è elevato. La probabilità post-test non assume infatti valori molto diversi dalla probabilità pre-test a priori. Sulla base del modello adottato, la prova colturale batteriologica ha una efficacia diagnostica moderata.

Ring test
Le concentrazioni finali effettive delle sospensioni usate per il test di concordanza sono risultate di 1753 e 110 CFU/ml rispettivamente. Dai 168

test eseguiti è risultato che la concordanza percentuale tra i risultati positivi ad alta carica è stata del 100% mentre, nei diversi laboratori, per i campioni a bassa carica, l'accordanza è stata di 62,5, 87,5, 75,0, 50,0 e la concordanza globale di 72,50%, inferiore quindi al 100%. Si ritiene tuttavia di ridimensionare il significato da assegnare al RT. Lo studio analitico effettuato per la stima del LOD aveva infatti già permesso di definire una cornice interpretativa entro la quale spiegare le (soltanto apparenti) *défaillance* del metodo a basse concentrazioni. La concentrazione del livello a bassa carica corrisponde infatti ad un LOD (= probabilità di rilevare positivi nelle repliche) stimato a circa 58,5. Il risultato ottenuto va quindi letto in modo favorevole e la differenza rispetto alla percentuale attesa di positività attribuibile ad oscillazione statistica.

CONCLUSIONI

Il progetto ha permesso di stabilire una base su cui fondare confronti tra test diversi ai fini della valutazione dell'efficacia diagnostica. E' stato stabilito un valore soglia per l'esame colturale che può aiutare nella diagnostica microbiologica quotidiana e nella corretta stima delle positività e quindi nelle generalizzazioni sulla prevalenza delle mastiti da CNS nella popolazione, spesso fatte in base ai risultati microbiologici.

Dal punto di vista diagnostico, sulla base del modello adottato, la prova colturale qualitativa non sembra avere grande rilevanza nei casi singoli e miglioramenti del metodo possono essere vagliati. Tuttavia, vi è da rilevare che, ai fini della corretta stima del valore diagnostico dell'esame microbiologico, anche un affinamento del modello di confronto dovrebbe essere auspicabile, includendo, per esempio, parametri ancora più indicativi dello stato infiammatorio della mammella, quali la composizione cellulare distinta per sottopopolazioni.

Seppure riconoscendo quindi che la prova colturale da sola non sia sufficiente a stabilire diagnosi di mastite (considerazione che peraltro può essere estesa ad altri test solitamente eseguiti a tal fine) il contributo dell'esame colturale risulta importante nell'identificazione della specie microbica responsabile e per fornire al veterinario curante strumenti terapeutici importanti quali le prove di sensibilità agli antibiotici.

SUMMARY

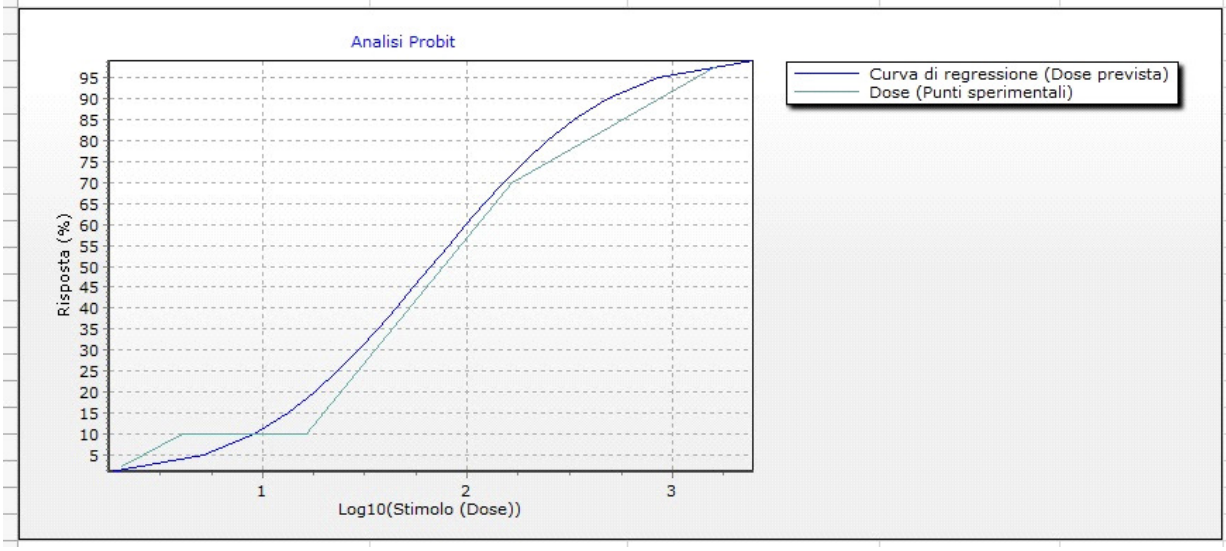
Diagnosis of Intramammary Infection: Assessment of the contribution of the microbiological method

The aim of the project was the definition of the diagnostic characteristics and effectiveness of the method adopted to detect pathogens in milk samples, mainly coagulase-negative staphylococci (CNS), responsible for subclinical mastitis and therefore difficult to diagnose (1). Since a reference gold standard is absent, the performance of the microbiological method were evaluated by comparison with a “conventional model” of chemical-clinical markers indicative of mastitis (somatic cell count, lactose and casein content of milk) (3). The following analytical parameters of the method were evaluated. Search of the best threshold for positivity. Since "environmental" microorganisms could be accidentally present in the milk sample and represent a sort of "background noise", a threshold for positivity, expressed in number of colonies (CFU), should be defined. It is also important in order to optimize the prevalence estimates, that are frequently obtained by microbiological results. Two approaches were used to evaluate the optimal threshold: CFUs content of milk samples were compared with the clinical reference standard by a concordance test (Cohen's K). The CFU value matching the maximum K was considered the best cut off value. A ROC approach was also used: sensitivity and specificity of the method were calculated for a series of assigned threshold values and the optimal cut-off identified by a ROC curve (5). Both approaches led to the same result of (approximately) 500 CFU/ml. Consequently, routinely performed cultural exams should be considered negative below 5 colonies present. Evaluation of LOD (Limit of Detection). Microbiological methods can yield negative results even if microrganisms are present in the sample. Thus the recovery rate of the pathogen at various concentrations is an important validation parameter. In qualitative methods the recovery is expressed as LOD, defined as the smallest concentration of analyte at which the test is positive in a certain percentage of cases (2). It is better to evaluate LOD50, the concentration corresponding to a probability of detection of 50% (2). The LOD of the culture method under study was determined according to AOAC guidelines (2). Milk samples spiked with staphylococci were inoculated in replicates on culture media, according to the test method. The percentage of positive cultures for each (known) concentration recorded and plotted in cartesian diagrams versus CFU concentrations. In the sigmoid curve obtained the LOD50 value was identified according to probit approach. LOD50 values for staphylococci resulted 67 CFU/ml. Other analytical parameters of the culture method were then estimated in order to have a complete picture of its diagnostic efficacy: sensitivity, specificity, accuracy, positive deviation and negative deviation with respect to the reference model (ISO 16140), predictive values, likelihood ratios, probability pre-and post-test (6), ROC analysis. The qualitative culture method showed a sensitivity of 0.80 and a specificity of 0.538, compared to the reference model adopted. Under our experimental conditions the probability that a test-positive animal is actually sick is 34% and 54% that a test-negative animal is healthy. The contributions to post-test probability (likelihood ratios) assigned a moderate efficacy to the diagnostic culture assay.

# Test	LOD50
#1	66,42 CI 95%: 32,00-183,80
#2	63,08 CI 95%: 9,53-417,61
#3	78,311 CI 95%: 14,13-434,80
#4	71,37 CI 95%: 48,49-105,18
#5	59,38 CI 95%: 38,53-91,60

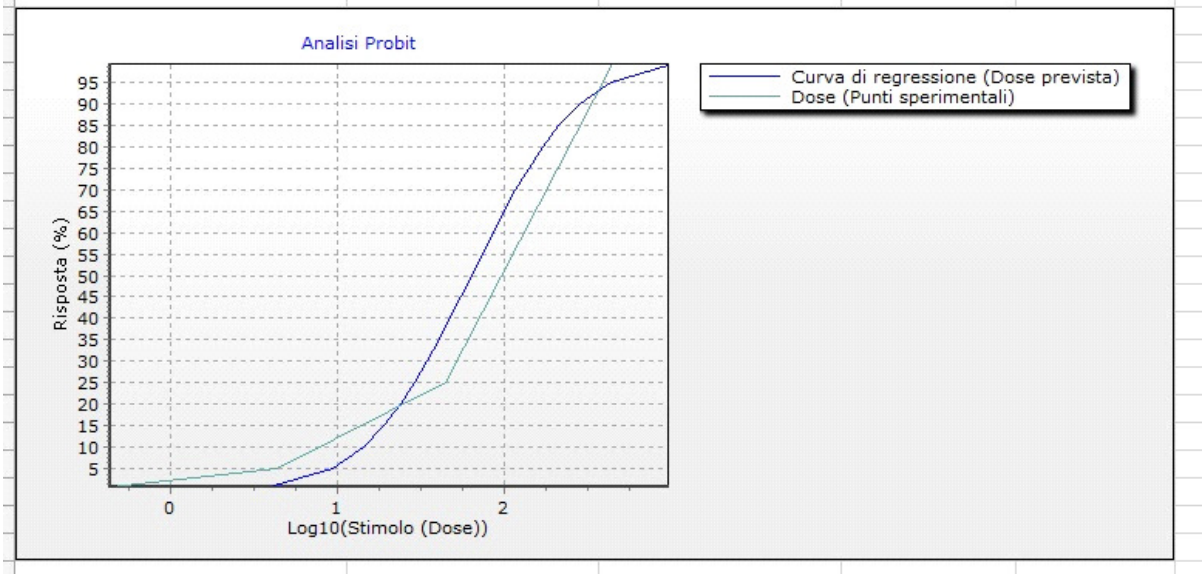
All. 9.1 – Valori del LOD50 ottenuti per stafilococco nei 5 test eseguiti con il metodo colturale qualitativo

Stastiche di Regressione			
LD50	**66.4224**	**LD50 Errore Standard**	**30.6102**
LD50 LCL	32.0036	*LD50 UCL*	183.7993
Log10[LD50]	1.8223	*Errore Standard*	0.1937
Beta	1.4823	*Segmento*	2.2987
Beta Errore Standard	0.3093		



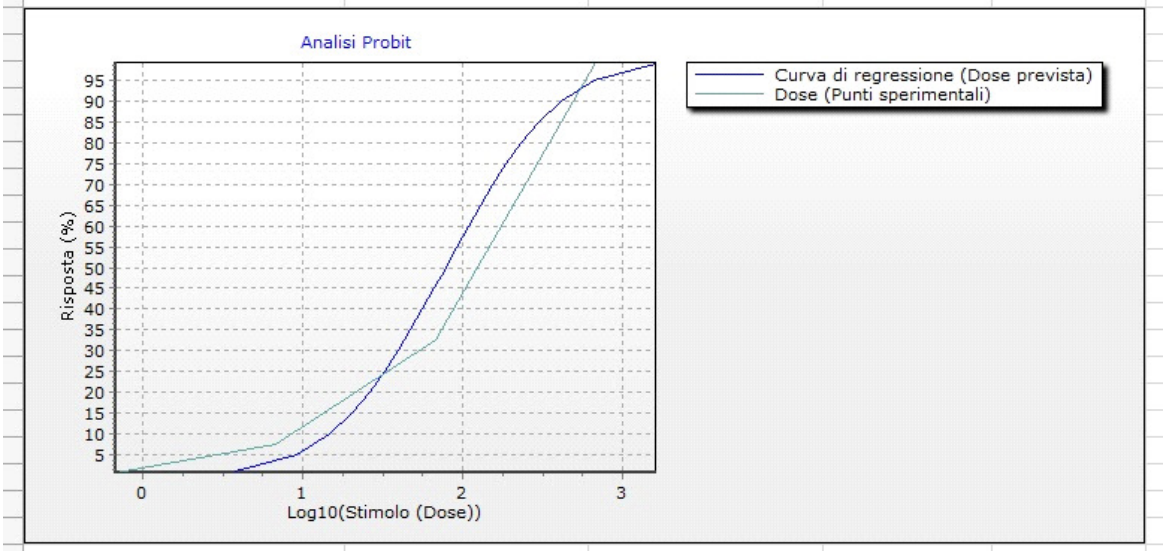
All. 9.2 – Curva e valore LOD50 ottenuti con il metodo probit per stafilococco(test #1)

LD50	**63.0819**	**LD50 Errore Standard**	**28.6089**
LD50 LCL	9.5287	*LD50 UCL*	417.614
Log10[LD50]	1.7999	*Errore Standard*	0.1908
Beta	1.9805	*Segmento*	1.4352
Beta Errore Standard	0.689		



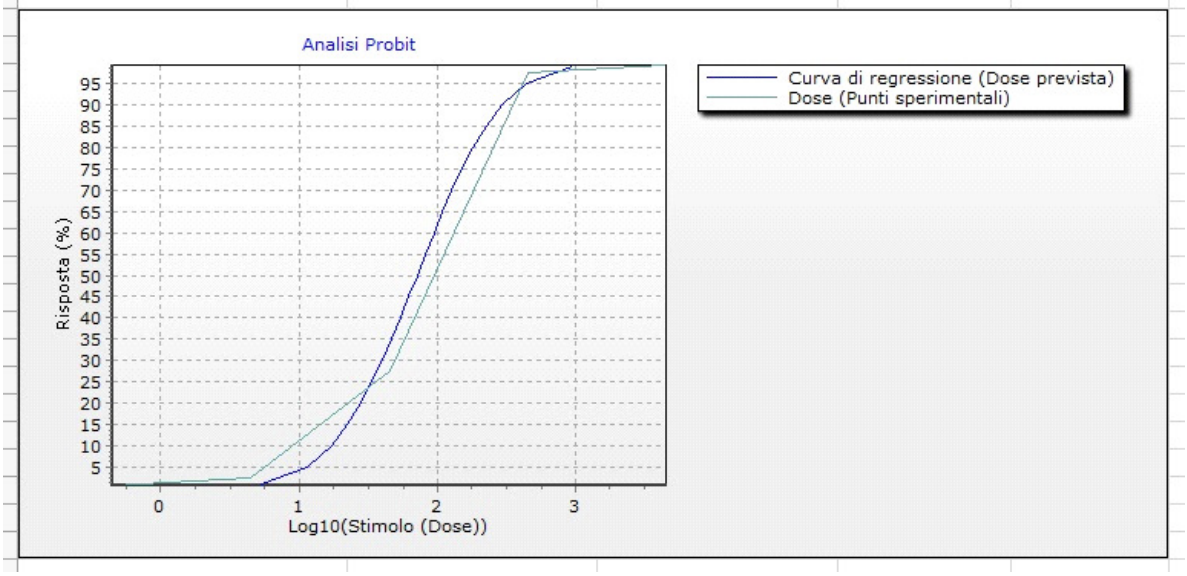
All. 9.3. – Curva e valore LOD50 ottenuti con il metodo probit per stafilococco(test #2)

Stastiche di Regressione			
LD50	**78.3811**	**LD50 Errore Standard**	**32.0397**
LD50 LCL	14.1297	*LD50 UCL*	434.7994
Log10[LD50]	1.8942	*Errore Standard*	0.1729
Beta	1.7742	*Segmento*	1.6393
Beta Errore Standard	0.4998		



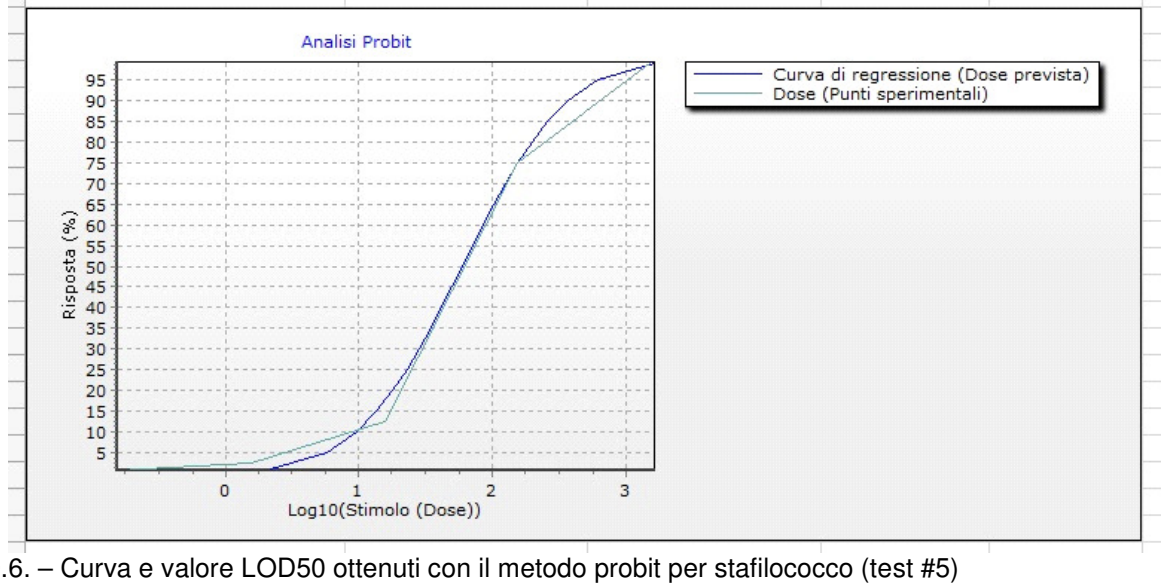
All. 9.4. – Curva e valore LOD50 ottenuti con il metodo probit per stafilococco(test #3)

LD50	**71.3669**	**LD50 Errore Standard**	**14.1893**
LD50 LCL	48.4875	*LD50 UCL*	105.1766
Log10[LD50]	1.8535	*Errore Standard*	0.0858
Beta	2.0723	*Segmento*	1.1591
Beta Errore Standard	0.3202		



All. 9.5. – Curva e valore LOD50 ottenuti con il metodo probit per stafilococco(test #4)

Stastiche di Regressione			
LD50	**59.3802**	**LD50 Errore Standard**	**13.2254**
LD50 LCL	38.5287	*LD50 UCL*	91.5989
Log10[LD50]	1.7736	*Errore Standard*	0.0959
Beta	1.6191	*Segmento*	2.1283
Beta Errore Standard	0.2208		



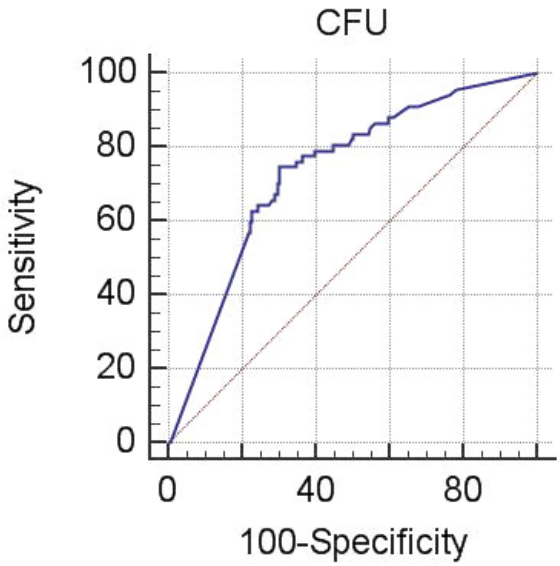
All. 9.6. – Curva e valore LOD50 ottenuti con il metodo probit per stafilococco (test #5)

SCC	Soglia CFU	Cohen's K max	Se	Sp	Youden J
>250000	520	0,367	0,7463	0,6872	0,4334
>500000	540	0,403	0,7813	0,7033	0,4845
>1000000	530	0,409	0,8033	0,7027	0,5060

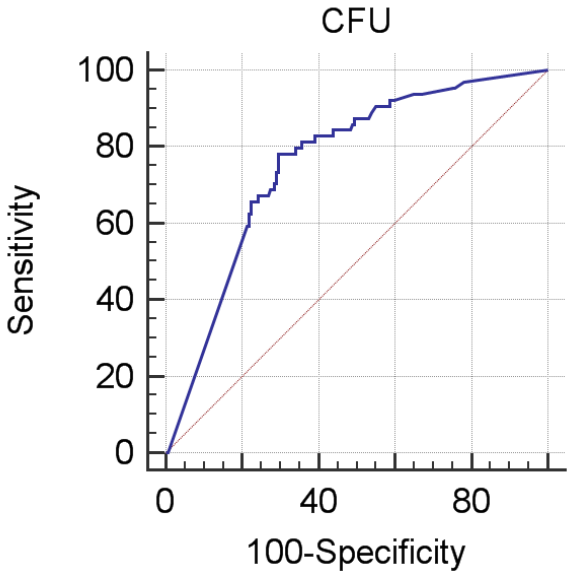
All. 9.7. – Valori di K, Se, Sp e J di Youden riscontrati nel confronto tra CFU e riferimento adottato per 3 livelli di SCC al variare della soglia CFU in corrispondenza dei valori in cui è stata osservata la massima concordanza K (N=246).

Kappa Statistic	*Strength of Agreement*
<0.00	Poor
0.00–0.20	Slight
0.21–0.40	Fair
0.41–0.60	Moderate
0.61–0.80	Substantial
0.81–1.00	Almost Perfect

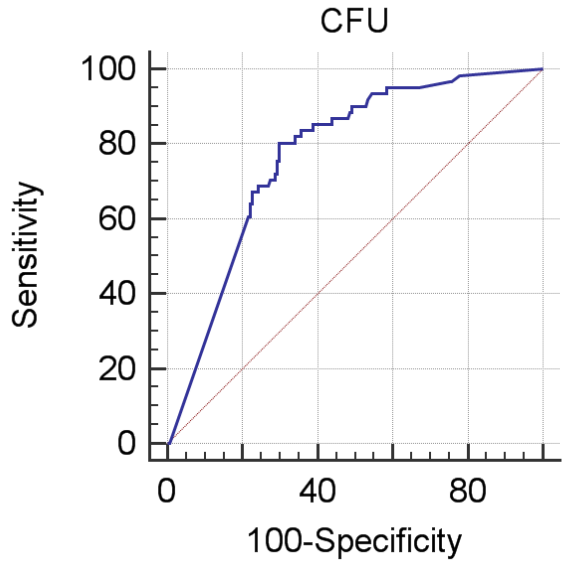
All. 9.8. – Scala di Landis e Koch per la valutazione dell'accordo K



All. 9.9. - Curva ROC risultante dal confronto dei valori di conteggio ottenuti rispetto al modello adottato con SCC>250000.



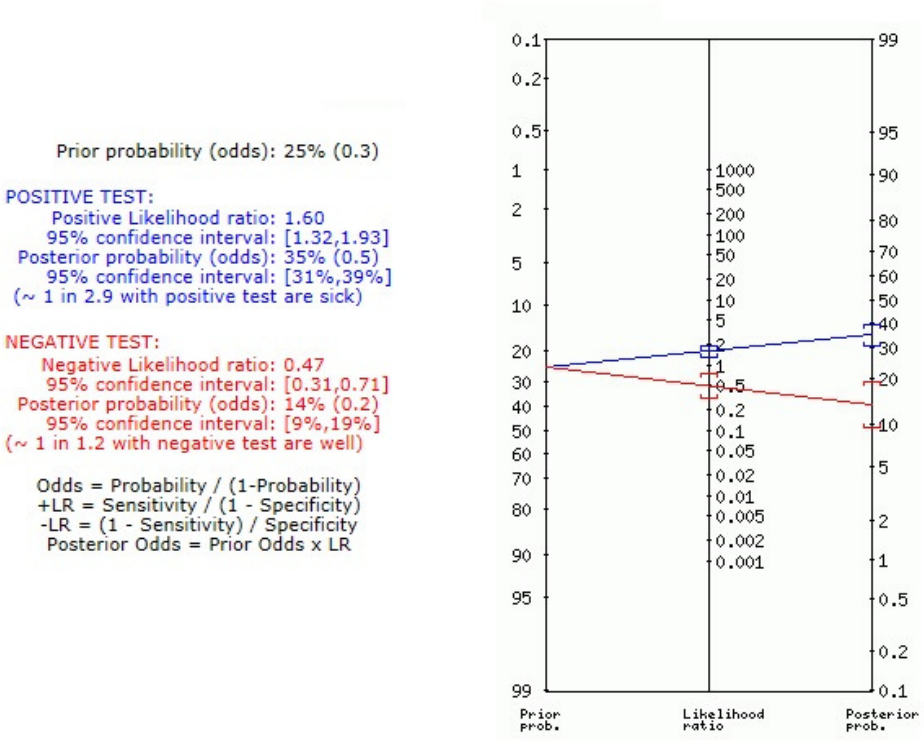
All. 9.10 - Curva ROC risultante dal confronto dei valori di conteggio ottenuti rispetto al modello adottato con SCC>500000.



All. 9.11 - Curva ROC risultante dal confronto dei valori di conteggio ottenuti rispetto al modello adottato con SCC>1000000.

SCC	Cut off CFU	Se	Sp	AUC	Youden J
>250000	520	0,7463	0,6872	0,734	0,4334
>500000	520	0,7813	0,6923	0,759	0,4736
>1000000	520	0,8033	0,6919	0,774	0,4952

All. 9.12. – Parametri associati alla soglia discriminante CFU a 3 livelli di SCC



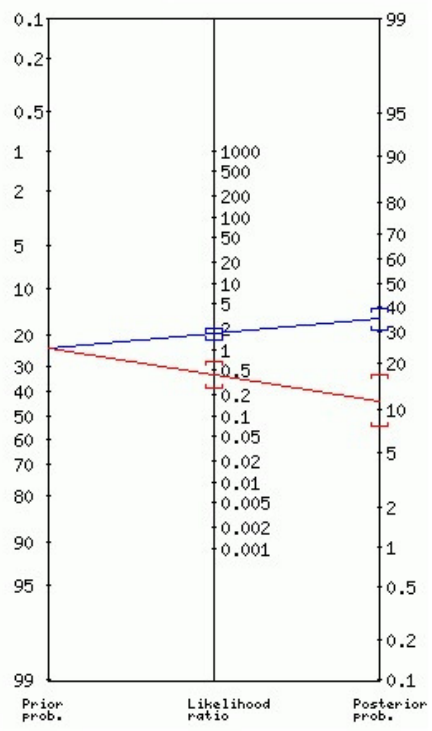
All. 9.13 – Diagramma di Fagan e indici di verosimiglianza relativi al confronto delle prestazioni dell'esame colturale qualitativo con il modello adottato (SCC>250000)

Prior probability (odds): 24% (0.3)

POSITIVE TEST:
Positive Likelihood ratio: 1.69
95% confidence interval: [1.40,2.03]
Posterior probability (odds): 35% (0.5)
95% confidence interval: [31%,39%]
(~ 1 in 2.9 with positive test are sick)

NEGATIVE TEST:
Negative Likelihood ratio: 0.41
95% confidence interval: [0.26,0.64]
Posterior probability (odds): 11% (0.1)
95% confidence interval: [8%,17%]
(~ 1 in 1.1 with negative test are well)

Odds = Probability / (1-Probability)
+LR = Sensitivity / (1 - Specificity)
-LR = (1 - Sensitivity) / Specificity
Posterior Odds = Prior Odds x LR



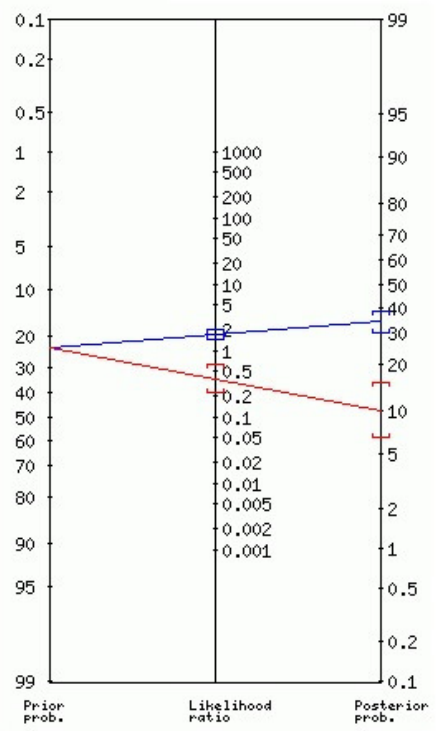
All. 9.14 – Diagramma di Fagan e indici di verosimiglianza relativi al confronto delle prestazioni dell'esame colturale qualitativo con il modello adottato (SCC>500000)

Prior probability (odds): 23% (0.3)

POSITIVE TEST:
Positive Likelihood ratio: 1.73
95% confidence interval: [1.45,2.08]
Posterior probability (odds): 34% (0.5)
95% confidence interval: [30%,38%]
(~ 1 in 2.9 with positive test are sick)

NEGATIVE TEST:
Negative Likelihood ratio: 0.37
95% confidence interval: [0.23,0.60]
Posterior probability (odds): 10% (0.1)
95% confidence interval: [6%,15%]
(~ 1 in 1.1 with negative test are well)

Odds = Probability / (1-Probability)
+LR = Sensitivity / (1 - Specificity)
-LR = (1 - Sensitivity) / Specificity
Posterior Odds = Prior Odds x LR



All. 9.15 – Diagramma di Fagan e indici di verosimiglianza relativi al confronto delle prestazioni dell'esame colturale qualitativo con il modello adottato (SCC>1000000). [Elaborazione con http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl]

BIBLIOGRAFIA

1. Pyorala, S., Taponen, S. Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. Veterinary Microbiology 134 (2009) 3–8
2. AOAC International Final Report and executive summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. 2006
3. CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). Protocols.for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. NCCLS document EP17-A, CLSI, USA, 2004
4. ISO 11843-2:2000
5. ISO 16140:2003
6. Hamilton, MA, Russo, RC, and Thurston RV. Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. Environmental Science & Technology, 11:7,1977
7. J AOAC Int. 2009 Nov-Dec;92(6):1763-72.
8. Wilrich C., Wilrich PT. Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. J AOAC Int. 2009, 92(6):1763-72.
9. Cannas, A. Relazione tra patogeni della mammella cellule somatiche nel latte ovino e caprino. Giornata di Studio SIPAOC “Cellule somatiche nel latte ovino e caprino”. Grosseto, 5 Novembre 2013.
10. Norma UNI EN ISO 7218:2013 - Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche
11. Norma ISO 14461-1:2005 Milk and milk products -- Quality control in microbiological laboratories -- Part 1: Analyst performance assessment for colony counts
12. Norma ISO 14461-2:2005 Milk and milk products -- Quality control in microbiological laboratories -- Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps
13. ISO 8261/IDF 122 – 2nd ed. 2001 - Milk and milk products - General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination
14. Ruegg, PL, Reinemann, DJ. Milk Quality and Mastitis Tests. University of Wisconsin Publication
15. Diagnostic test calculator (version 2010042101). Copyright (c) 2002-2006 by Alan Schwartz; http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl
16. MedCalc - User-friendly statistical software. Version 13.3 - Last modified: Jun 21, 2014 © 1993-2014 MedCalc Software bvba MedCalc Software, Acacialaan 22, B-8400 Ostend, Belgium. http://www.medcalc.org/index.php
17. Graphpad Software QuickCalcs ©2014 GraphPad Software, Inc., http://graphpad.com/quickcalcs

18. Holt, J.C., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. William & Wilkins, Baltimore.
19. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales, Educational and Psychological Measurement, XX:1, pp.37-46
20. Soliani L. Manuale di statistica, 2005
21. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 9th ed.
22. 2-way Contingency Table Analysis Revised, 07/23/2013 http://statpages.org/ctab2x2.html
23. Greiner M1, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med. 2000 45(1-2):23-41.
24. Fagan TJ. Nomogram for Bayes Theorem. N Engl J Med 1975;293:257.
25. OIE – World Organisation for Animal Health, OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2014
26. AOAC International Final Report and executive summaries from the AOAC International Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. 2006

///