



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna, 148 - 10154 - TORINO

S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico
Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI
S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio
Responsabile Dr. Giuseppe RU

Tel. n.: 011/2686372 - Fax: n. 011/2686371
e-mail: bear@izsto.it

**RING TEST IHC 2016 - SC Neuroscienze - Lab. Neuropatologia -
CEA**

**Riproducibilità interlaboratorio per il metodo
Immunoistochimico**

Elaborazione statistica dei risultati

Indice

1. Introduzione

2. Materiali e metodi per l'analisi statistica

2.1 Organizzazione del database

2.2 Valutazione della riproducibilità interlaboratorio

3. Risultati. Valutazione della riproducibilità

4. Conclusioni e spunti di discussione

5. Appendice: tabelle e figure

Riferimenti bibliografici

1. Introduzione

Il laboratorio di Neuropatologia del CEA, ha organizzato un RT allo scopo di verificare la riproducibilità interlaboratorio dell'esame immunoistochimico (IHC) utilizzato per le prove di conferma da eseguire sui campioni risultati positivi ai test di screening per la diagnosi di EST.

Al RT hanno partecipato 9 lettori, operanti nei laboratori delle sedi centrali degli IIZZSS dislocati sul territorio nazionale, incluso il laboratorio di Neuropatologia del CEA.

E' stato predisposto un set di 20 campioni, di cui 11 provenienti da capi ovini e 9 da bovini, già sottoposti a prove diagnostiche presso l'LNR, composto da 10 positivi, 4 negativi e 6 non valutabili (esito espresso in termini qualitativi). Una volta ottenuti i risultati da tutti i partecipanti al RT, il laboratorio di Neuropatologia li ha inviati al Bear affinché potesse svolgere l'elaborazione statistica.

2. Materiali e metodi per l'analisi statistica

2.1 Organizzazione del database

Per poter svolgere l'analisi il Bear ha organizzato i dati inviati su foglio elettronico da ciascun partecipante al CEA in un database ad hoc, in modo da poterli elaborare e conservare in vista dell'eventuale allestimento di prove di ripetibilità o consentire confronti con RT futuri.

Il software statistico utilizzato per l'analisi è "Stata Corp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14.1. College Station, TX: StatCorp LP".

2.2 Valutazione della riproducibilità interlaboratorio

La riproducibilità (o concordanza) del metodo IHC è stata valutata mediante indice K di Cohen. Tale indice consente di isolare la reale concordanza tra



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna, 148 - 10154 - TORINO

S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico
Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI
S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio
Responsabile Dr. Giuseppe RU

Tel. n.: 011/2686372 - Fax: n. 011/2686371
e-mail: bear@izsto.it

laboratori eliminandone la componente esclusivamente dovuta al caso, indipendentemente dalla correttezza diagnostica dei risultati. Poiché l'indice K può assumere valori compresi tra -1 (concordanza inferiore a quella che si avrebbe per effetto del solo caso) e 1 (accordo totale), in bibliografia sono considerati accettabili valori di $k > 0,40$ ed eccellenti valori di $k > 0,75$ (si veda in Tab. 2 un aiuto all'interpretazione dei valori assunti dal K). Per ciascuna delle stime puntuali di K ottenute è stato calcolato il relativo intervallo di confidenza al 95% (d'ora in avanti indicato con IC95% oppure con lb-ub).

Pertanto, si è provveduto a calcolare:

- 1) il K per ciascuna coppia di laboratori partecipanti;
- 2) il K combined complessivo per l'intera rete dei laboratori partecipanti;
- 3) il K per ciascun partecipante rispetto al GM¹.

Infine, si precisa che la numerosità campionaria $n=20$ è stata individuata in modo tale che, in caso di perfetta concordanza tra i risultati forniti da 2 partecipanti (cioè $K=1$) il lb dell'IC95% fosse pari ad almeno 0.60; in caso di 1 sola discordanza, il lb fosse superiore a 0.597; in caso di 2 discordanze, il lb fosse superiore a 0.518; ovvero si mantenesse in un range di accettabilità.

3. Risultati. Valutazione della riproducibilità

Seguendo lo schema dell'elaborazione delineato nella sezione precedente, in Tabella 3 sono riportati i risultati comunicati dai partecipanti e successivamente utilizzati per la valutazione della riproducibilità interlaboratorio.

Osservando gli esiti riportati dai singoli partecipanti si nota che risultano diverse discordanze; in particolare, la maggior parte di esse si concentra in relazione ai campioni 7, 9 e 15. Per quest'ultimo campione non è possibile pervenire ad un GM univoco (e la relativa cella resta vuota) perchè su 9 lettori 4 esprimono un esito=Neg, 4 un esito=NV, 1 un esito=Pos, per un totale di 5 discordanze sullo stesso campione (laboratori 1, 3, 4, 5, 6).

Le 45 coppie di confronti tra ciascun partecipante e i restanti (Tab. 4) presentano in generale un livello di accordo che, considerando il lb, va da accettabile (lb quasi sempre compreso tra 0.4 e 0.6) a buono, e in 3 dei confronti di L01 con altri laboratori risulta invece compatibile nel peggiore degli scenari con un accordo reale "critico" ($K=0.6863$, con $lb=0.3749$; $K=0.6735$, con $lb=0.3574$; $K=0.6863$, con $lb=0.373$), essendo il lb inferiore a 0.40. Da buoni a molto buoni risultano invece i valori puntuali dei K, con valori sempre superiori a 0.6. Solo 4 su 45 confronti indicano un accordo perfetto ($K=1$).

Visto il consistente numero di discordanze registrate tra i laboratori, la valutazione dell'accordo tra il singolo partecipante e il GM ricalca quanto riportato immediatamente sopra (v. Tab. 5, Fig. 1). Solo per 3 laboratori su 9 (L02, L08 e L09) si osserva un livello di accordo con il GM (ovvero con la maggioranza dei laboratori) perfetto ($K=1$) in termini di valore puntuale e buono anche in termini di lb (>0.6).

Infine, la valutazione della riproducibilità complessiva dell'intera rete diagnostica coinvolta nel RT riassume il livello di accordo registrato nei confronti a coppie: infatti il **K-combined** risulta pari a **0.8363 (IC95% 0.7836,**

1 Il GM è l'esito indicato dalla maggioranza dei partecipanti, in merito ad ogni singolo campione.

	<p>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta Via Bologna, 148 - 10154 – TORINO</p> <p>S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI</p> <p>S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio Responsabile Dr. Giuseppe RU</p> <p>Tel. n.: 011/2686372 - Fax: n. 011/2686371 e-mail: bear@izsto.it</p>
---	---

0.8889), ovvero molto buono per quanto riguarda il suo valore puntuale, buono nel valore del lb.

4. Conclusioni e spunti di discussione

Trattandosi del primo RT non esiste la possibilità di effettuare confronti temporali per quanto riguarda le performances in termini di riproducibilità interlaboratorio dell'esame IHC.

Il numero non indifferente di discordanze pare concentrarsi nella maggior parte dei casi in relazione all'attribuzione dell'esito negativo e non valutabile.

5. Appendice: tabelle e figure

Tab.1: elenco delle abbreviazioni utilizzate

Abbreviazione	Descrizione
Bear	SS Biostatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio
CdR	Centro di Riferenza
CEA	Centro di Riferenza per le Encefalopatie Animali
esitoL01	Esito laboratorio/lettore 1
GM	Giudizio di maggioranza
IC95%	Intervallo di confidenza al 95%
IHC	esame Immunoistochimico
IIZZSS	Istituti Zooprofilattici Sperimentali
lb	lower bound; limite inferiore dell'IC95%
LNR	Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Tse
NV	Non valutabile
RT	Ring Test
EST	Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili
ub	upper bound; limite superiore dell'IC95%

Tab. 2: interpretazione dei valori del K di Cohen

Valori di K	Interpretazioni proposte in letteratura			
	Landis, Koch	Altman	Fleiss	Byrt
≤ 0	Poor	Poor	Poor	No agreement
0.01-0.20	Slight	Poor	Poor	Poor
0.21-0.40	Fair	Fair	Poor	Slight



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna,148 - 10154 – TORINO

S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico
Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI
S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio
Responsabile Dr. Giuseppe RU

Tel. n.:011/2686372 - Fax: n. 011/2686371
e-mail: bear@izsto.it

0.41-0.60	Moderate	Moderate	Fair to good	Fair
0.61-0.80	Substantial	Good	Fair to good	Good
0.81-1.00	Almost perfect	Very good	Excellent (≥ 0.75)	Very good (Excellent ≥ 0.92)

Tab.3: esiti comunicati dai partecipanti e GM

id_camp	esitoL01	esitoL02	esitoL03	esitoL04	esitoL05	esitoL06	esitoL07	esitoL08	esitoL09	gm
1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
4	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
6	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
7	NV	NV	NEG	NEG	NEG	NEG	NV	NV	NV	NV
8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
9	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
10	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
11	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
12	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
13	NEG	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
14	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
15	NEG	NV	NEG	NEG	POS	NEG	NV	NV	NV	.
16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
17	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
18	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
19	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
20	NV	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Tab. 4: calcolo k tutti contro tutti (k_{tct}) per ciascuna coppia di lettori e IC95%
(in grassetto: valori del k < 0.6; in rosso valori del k critici, < 0.4)

Confronto il lettore1 con il lettore2: k = .76 (.4449 , 1)
Confronto il lettore1 con il lettore3: k = .6863 (.3749 , .9977)
Confronto il lettore1 con il lettore4: k = .76 (.4449 , 1)
Confronto il lettore1 con il lettore5: k = .6735 (.3574 , .9896)
Confronto il lettore1 con il lettore6: k = .76 (.4449 , 1)
Confronto il lettore1 con il lettore7: k = .6863 (.373 , .9996)
Confronto il lettore1 con il lettore8: k = .76 (.4449 , 1)
Confronto il lettore1 con il lettore9: k = .76 (.4449 , 1)

Confronto il lettore2 con il lettore3: k = .7674 (.4645 , 1)
Confronto il lettore2 con il lettore4: k = .8413 (.5326 , 1)
Confronto il lettore2 con il lettore5: k = .8374 (.5252 , 1)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna, 148 - 10154 – TORINO

S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico
Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI
S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio
Responsabile Dr. Giuseppe RU

Tel. n.: 011/2686372 - Fax: n. 011/2686371
e-mail: bear@izsto.it

Confronto il lettore2 con il lettore6: k = .8413 (.5326 , 1)
Confronto il lettore2 con il lettore7: k = .9213 (.6065 , 1)
Confronto il lettore2 con il lettore8: k = 1 (.6804 , 1)
Confronto il lettore2 con il lettore9: k = 1 (.6804 , 1)

Confronto il lettore3 con il lettore4: k = .9206 (.6027 , 1)
Confronto il lettore3 con il lettore5: k = .84 (.5267 , 1)
Confronto il lettore3 con il lettore6: k = .9206 (.6027 , 1)
Confronto il lettore3 con il lettore7: k = .8462 (.5388 , 1)
Confronto il lettore3 con il lettore8: k = .7674 (.4645 , 1)
Confronto il lettore3 con il lettore9: k = .7674 (.4645 , 1)

Confronto il lettore4 con il lettore5: k = .918 (.5999 , 1)
Confronto il lettore4 con il lettore6: k = 1 (.6804 , 1)
Confronto il lettore4 con il lettore7: k = .7656 (.4559 , 1)
Confronto il lettore4 con il lettore8: k = .8413 (.5326 , 1)
Confronto il lettore4 con il lettore9: k = .8413 (.5326 , 1)

Confronto il lettore5 con il lettore6: k = .918 (.5999 , 1)
Confronto il lettore5 con il lettore7: k = .7619 (.4522 , 1)
Confronto il lettore5 con il lettore8: k = .8374 (.5252 , 1)
Confronto il lettore5 con il lettore9: k = .8374 (.5252 , 1)

Confronto il lettore6 con il lettore7: k = .7656 (.4559 , 1)
Confronto il lettore6 con il lettore8: k = .8413 (.5326 , 1)
Confronto il lettore6 con il lettore9: k = .8413 (.5326 , 1)

Confronto il lettore7 con il lettore8: k = .9213 (.6065 , 1)
Confronto il lettore7 con il lettore9: k = .9213 (.6065 , 1)

Confronto il lettore8 con il lettore9: k = 1 (.6804 , 1)

Tab. 5: calcolo k di ciascun lettore vs il giudizio di maggioranza (GM)

(in grassetto: valori del k < 0.6)
Confronto L01 esito con GM: k = .8273 (.5003 , 1)
Confronto L02 esito con GM: k = 1 (.673 , 1)
Confronto L03 esito con GM: k = .8326 (.5141 , 1)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna, 148 - 10154 - TORINO

S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico
Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI
S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio
Responsabile Dr. Giuseppe RU

Tel. n.: 011/2686372 - Fax: n. 011/2686371
e-mail: bear@izsto.it

Confronto L04 esito con GM: $k = .914$ (.5904 , 1)

Confronto L05 esito con GM: $k = .914$ (.5904 , 1)

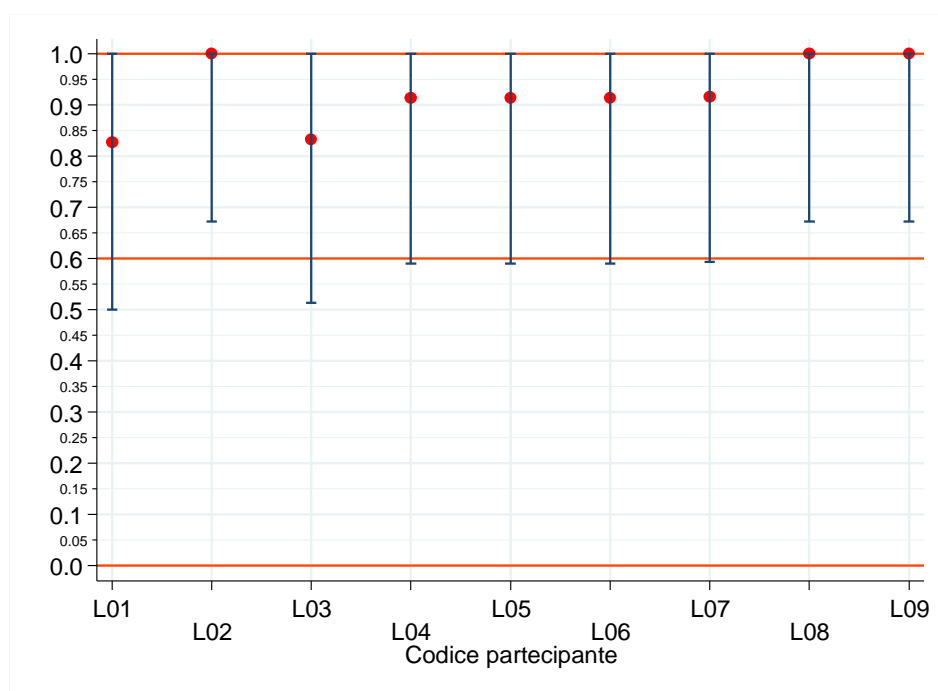
Confronto L06 esito con GM: $k = .914$ (.5904 , 1)

Confronto L07 esito con GM: $k = .9159$ (.5933 , 1)

Confronto L08 esito con GM: $k = 1$ (.673 , 1)

Confronto L09 esito con GM: $k = 1$ (.673 , 1)

Fig. 1: K (+IC95%) per i cfr tra ciascun partecipante rispetto al GM



(le linee rosse orizzontali indicano il range di accettabilità dei valori del K)

Riferimenti bibliografici

D.G. Altman. In Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hall/CRC, London - (UK), 2nd edition, 1991.
T. Byrt. How good is that agreement? Epidemiology, 7:561, 1996.
J.L. Fleiss, B. Levin, and M.C. Paik. In Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley & Sons, New York - USA, 3rd edition, 2003.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
Via Bologna, 148 - 10154 – TORINO

S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico
Responsabile: Dr.ssa Laura CHIAVACCI
S.S. Biostatistica Epidemiologia e Analisi del Rischio
Responsabile Dr. Giuseppe RU

Tel. n.: 011/2686372 - Fax: n. 011/2686371
e-mail: bear@izsto.it

J.R. Landis and G.G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data.
Biometrics, 33:159{174, Mar 1977.