

# Risultati Circuito MD 2013

## Schema Microbiologia Diagnostica

---

**Circuito Interlaboratorio AQUA**  
**Schema Microbiologia Diagnostica**

Ricerca di: *Taylorella equigenitalis*

ANNO 2013

## 1. Introduzione

Il circuito interlaboratorio di Microbiologia Diagnostica, ricerca *Taylorella equigenitalis*, organizzato dal Laboratorio di Diagnostica Clinica di Padova – Struttura Complessa Territoriale 3, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie è nato dall'esigenza di disporre di uno strumento oggettivo per permettere il confronto di metodiche analitiche e lo scambio di informazioni tecnico-scientifiche tra laboratori. I circuiti interlaboratorio rappresentano, infatti, importanti momenti di confronto per poter valutare la corretta esecuzione delle procedure di prova, per evidenziare problematiche operative nei confronti delle quali mettere in atto azioni correttive, per garantire l'assicurazione qualità dei risultati e valutare le performance di laboratorio, inclusi quelli che svolgono attività di tipo diagnostico.

Partecipano al circuito sia laboratori territoriali dell'IZSVE, sia laboratori di altri Istituti. I primi per l'esecuzione della prova applicano la procedura PDP DIA 03, redatta secondo le linee guida indicate nel Manuale OIE; i secondi applicano le rispettive procedure di prova in uso presso il laboratorio.

La preparazione dei campioni-prova prevede l'utilizzo di ceppi batterici di riferimento (ATCC, NCTC) e di ceppi batterici isolati e identificati nel corso dell'attività diagnostica.

Il circuito comprende una distribuzione/anno costituita da 10 campioni prova prodotti con le seguenti caratteristiche: colture pure di *Taylorella equigenitalis*; colture miste di uno o più ceppi batterici associati o meno a *Taylorella equigenitalis*, campioni sterili e flora microbica mista ottenuta da tamponi prepuziali di equino.

Per ogni lotto di campioni-prova prodotto, sono eseguite prove di omogeneità e di stabilità. Tali prove sono ripetute su tutti i lotti scelti per il circuito, al momento dell'invio e ripetute durante il periodo previsto per la spedizione degli stessi, a garanzia della stabilità dei campioni prova fino al momento dell'utilizzo da parte dei laboratori partecipanti.

I campioni prova, opportunamente identificati, sono inviati a temperatura controllata ( $+4^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), mediante corriere, rispettando le condizioni previste dalla normativa vigente riguardante il trasporto di materiale biologico e la documentazione relativa.

Sul sito web dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ([www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it)) sono disponibili i documenti di carattere generale del circuito AQUA (organizzazione, scheda di sicurezza) e i documenti specifici dello schema Microbiologia Diagnostica - MD (istruzioni d'uso, modalità per l'inserimento dei risultati, report).

I risultati dei laboratori partecipanti sono elaborati statisticamente, utilizzando la statistica K di Cohen (K) che permette di valutare il grado di concordanza tra risultati attesi e risultati dal singolo laboratorio; è stato inoltre calcolato un K complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

## 2. Bibliografia

- Douglas C. (2005) “Controllo statistico della qualità”. McGraw-Hill Companies
- Grimaldi M., Bordin P., Mioni R., Comin D., Trevisan R., Mancin M., Milan F. (2007) “L’assicurazione della qualità dei risultati tramite l’utilizzo di circuiti interlaboratorio. Esperienze dei laboratori di Microbiologia Alimentare dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie”. *Biologi Italiani* 4, 68 –73.
- Quinn P.J., Carter M.E. et Al. (1994) “Clinical Veterinary Microbiology”. Wolfe Ed., 178-179.
- Sidney Siegel, N. John Castellan Jr. (1992) “Statistica non parametrica”. McGraw-Hill Companies
- Contagious equine metritis. “Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals” (2012) OIE, chapter 2.5.2
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura
- ISO\IEC 17043:2010 “Conformity assessment – General requirements for proficiency testing”

## 3. Composizione dei campioni prova

### Circuito AQUA-MD 2013

Campioni prova	Composizione
<b>A/13</b>	Sterile
<b>B/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184
<b>C/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; Flora microbica da prepuzio di equino I 12/L11
<b>D/13</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC2 7853
<b>E/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Candida tropicalis</i> 10/L09; <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<b>F/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Candida tropicalis</i> 10/L09
<b>G/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC2 7853
<b>H/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> ceppo di campo 15/L13
<b>I/13</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Candida tropicalis</i> 10/L09; <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC2 7853
<b>L/13</b>	Flora microbica da prepuzio di equino II 14/L12

## 4. Indicazioni generali

### 4.1 Allestimento dei campioni prova

1. Preparazione delle sospensioni batteriche, costituite da flora microbica prepuziale ottenuta valutando più tamponi prepuziali equini, risultati negativi per la ricerca di *T. equigenitalis*
2. Identificazione di massima delle specie microbiche presenti nelle selezioni di flora prepuziale

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

3. Preparazione delle sospensioni di flora microbica con concentrazioni diverse di *T. equigenitalis* per verificarne la stabilità
4. Valutazione della crescita in piastra dei diversi ceppi e selezione delle combinazioni batteriche in grado di garantire la presenza nella matrice “tampono” di un numero sufficiente di colonie di *T. equigenitalis* per poter essere individuate tra la flora microbica competitiva.
5. Allestimento delle matrici “tampono” mediante breve immersione fino a imbibizione del tampono nelle sospensioni batteriche selezionate e inserimento del tampono nella provetta contenente terreno di Stuart con carbone.
6. Verifica della stabilità e vitalità della componente microbica e di *T. equigenitalis* in particolare, con prove di crescita effettuate dopo 1,2,3,4 giorni dalla preparazione/distribuzione dei tamponi.

### 4.2 Raccomandazioni

- **Inizio prova entro 48 ore dalla data di distribuzione**

### 4.3 Gestione dei campioni prova

- Semina dei campioni prova entro 48 ore dalla data di distribuzione (intesa come data del prelievo) analogamente a quanto previsto per i tamponi genitali equini.
- Utilizzo delle procedure di prova in uso presso il laboratorio.

## 5. Determinazioni e valori assegnati

Determinazione	Valore assegnato
Ricerca di <i>Taylorella equigenitalis</i>	Presente/Assente

## 6. Interpretazione dei risultati

L'analisi dei campioni prova fornisce una risposta di tipo qualitativo: “**presente**”, nel caso sia evidenziata la presenza di *Taylorella equigenitalis*; “**assente**”, nel caso in cui la sua presenza non sia rilevata.

I dati raccolti dai laboratori partecipanti sono elaborati statisticamente utilizzando la statistica K di Cohen, che fornisce una misura dell'accordo (*coefficient of agreement*) tra le risposte qualitative fornite dai laboratori partecipanti e il risultato atteso.

## 7. Termini e abbreviazioni

Termini	Abbreviazioni
Concordanza/Riproducibilità	K
Non Pervenuto	np
Significatività statistica	p-value
Presenza/assenza	+/-

Per l'interpretazione dei valori del K di Cohen, si rimanda alla scala di *Landis & Koch* di seguito riportata:

<b>K</b>	<b>Riproducibilità</b>
≤ 0	Scarsissima
0.01-0.20	Scarsa
0.21-0.40	Discreta
0.41-0.60	Moderata
0.61-0.80	Buona
0.81-1.00	Ottima

### 8. Ruoli e responsabilità

Responsabile Circuito AQUA-MD Dr.ssa Michela Corrò	e-mail <a href="mailto:mcorro@izsvenezie.it">mcorro@izsvenezie.it</a>
Responsabile tecnico Sig.ra Silvia Friso	e-mail <a href="mailto:sfriso@izsvenezie.it">sfriso@izsvenezie.it</a>
Responsabile statistico Dr.ssa Marzia Mancin	e-mail <a href="mailto:crev.mmancin@izsvenezie.it">crev.mmancin@izsvenezie.it</a>
Assicuratore Qualità Dr. Luciano Iob	e-mail <a href="mailto:liob@izsvenezie.it">liob@izsvenezie.it</a>

9. Laboratori partecipanti



Figura 1: laboratori partecipanti  
Schema MD 2013

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

### 10. Risultati

#### 10.1 Risultati attesi e risultati osservati per laboratorio partecipante

<b>CIRCUITO INTERLABORATORIO MD 2013</b>										
<b>Codice Identificativo</b>	<b>A/13</b>	<b>B/13</b>	<b>C/13</b>	<b>D/13</b>	<b>E/13</b>	<b>F/13</b>	<b>G/13</b>	<b>H/13</b>	<b>I/13</b>	<b>L/13</b>
<b>Risultato atteso</b>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
L000015	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000025	-	+	-	-	-	+	+	+	nv	-
L000031	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000042	-	+	-	-	-	-	+	-	nv	-
L000065	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000066	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000067	-	+	-	-	-	+	+	+	nv	-
L000073	-	+	-	-	-	-	+	+	nv	-
L000075	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000079	-	-	-	-	+	+	+	+	nv	-
L000098	-	+	-	-	+	-	+	-	nv	-
L000115	-	+	+	-	+	-	+	+	nv	-
L000120	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000123	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000138	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000139	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000148	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000168	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
L000173	-	+	+	-	-	-	+	+	nv	+
L000186	-	+	+	-	+	+	+	+	nv	-
<b>corretto/totale</b>	<b>20/20</b>	<b>19/20</b>	<b>14/20</b>	<b>20/20</b>	<b>15/20</b>	<b>15/20</b>	<b>20/20</b>	<b>18/20</b>	<b>10/20</b>	<b>19/20</b>

nv = non valutato; campione prova I/13 non valutato causa criticità d'isolamento riscontrata nel 50% dei laboratori

# Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

## 10.2 Statistica K di Cohen

Si riporta di seguito il calcolo della statistica K di Cohen per valutare la concordanza tra esito atteso e risultato del laboratorio partecipante e un K di Cohen complessivo che valuta la concordanza tra tutti i laboratori partecipanti.

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000015

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	55.56%	1.0000	0.3333	3.00	0.0013

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000025

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
77.78%	48.15%	0.5714	0.3012	1.90	0.0289

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000031

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	55.56%	1.0000	0.3333	3.00	0.0013

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000042

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
55.56%	40.74%	0.2500	0.2205	1.13	0.1284

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000065

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	55.56%	1.0000	0.3333	3.00	0.0013

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000066

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	55.56%	1.0000	0.3333	3.00	0.0013

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000067

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
77.78%	48.15%	0.5714	0.3012	1.90	0.0289

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000073

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
66.67%	44.44%	0.4000	0.2667	1.50	0.0668

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000075

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	55.56%	1.0000	0.3333	3.00	0.0013

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000079

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
77.78%	48.15%	0.5714	0.3012	1.90	0.0289

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000098

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
66.67%	44.44%	0.4000	0.2667	1.50	0.0668

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000115

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
88.89%	51.85%	0.7692	0.3243	2.37	0.0089

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000120

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----------	--------------------	-------	-----------	---	--------

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

-----  
 100.00%      55.56%      **1.0000**      0.3333      3.00      0.0013

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000123**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----
100.00%	55.56%	<b>1.0000</b>	0.3333	3.00	0.0013

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000138**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----
100.00%	55.56%	<b>1.0000</b>	0.3333	3.00	0.0013

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000139**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----
100.00%	55.56%	<b>1.0000</b>	0.3333	3.00	0.0013

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000148**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----
100.00%	55.56%	<b>1.0000</b>	0.3333	3.00	0.0013

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000168**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----
100.00%	55.56%	<b>1.0000</b>	0.3333	3.00	0.0013

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000173**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----
66.67%	51.85%	<b>0.3077</b>	0.3243	0.95	0.1714

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000186**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
-----	-----	-----	-----	-----	-----

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

100.00%      55.56%      **1.0000**      0.3333      3.00      0.0013

### KAPPA COMPLESSIVO

#### Calcolo del valore k su tutti i laboratori

Two-outcomes, multiple raters:

Kappa	Z	Prob>Z
<b>0.6332</b>	26.19	<b>0.0000</b>

(Leggenda: Agreement = accordo osservato; Expected = accordo atteso; kappa = statistica K di Cohen; std.Err. = errore standard della statistica Kappa; z = statistica test per verificare l'ipotesi nulla H0= assenza di accordo; Prob>Z = livello di significatività della statistica Z)

### 10.3 Riassunto dei risultati

Laboratorio	L000015	L000025	L000031	L000042	L000065
<b>kappa</b>	1,0000	0,5714	1,0000	0,2500	1,0000
<b>p-value</b>	0,0013	0,0289	0,0013	0,1284	0,0013

Laboratorio	L000066	L000067	L000073	L000075	L000079
<b>kappa</b>	1,0000	0,5714	0,4000	1,0000	0,5714
<b>p-value</b>	0,0013	0,0289	0,0668	0,0013	0,0289

Laboratorio	L000098	L000115	L000120	L000123	L000138
<b>kappa</b>	0,4000	0,7692	1,0000	1,0000	1,0000
<b>p-value</b>	0,0668	0,0089	0,0013	0,0013	0,0013

Laboratorio	L000139	L000148	L000168	L000173	L000186	<b>Complessivo</b>
<b>kappa</b>	1,0000	1,0000	1,0000	0,3077	1,0000	<b>0,6332</b>
<b>p-value</b>	0,0013	0,0013	0,0013	0,1714	0,0013	<b>0,0000</b>

**Note:** per l'interpretazione dei valori del K di Cohen si rimanda alla scala di *Landis & Koch*

11. Circuito interlaboratorio MD 2013: conclusioni ed osservazioni

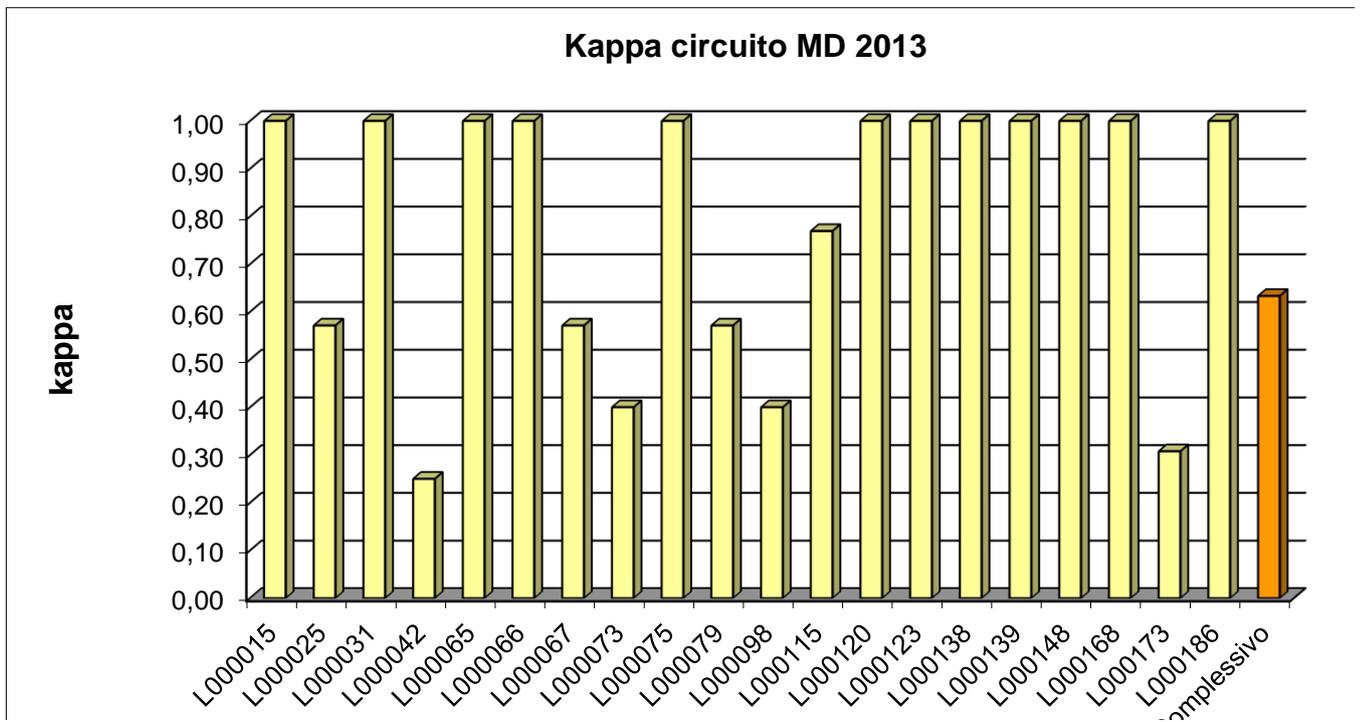


Figura 2: valori di Kappa dei laboratori partecipanti e Kappa complessivo MD 2013

I laboratori **L000073**, **L000098**, valutando il valore k nella scala di *Landis & Koch*, mostrano una **discreta** concordanza con i risultati attesi del circuito MD 2013, con p-value <0,10 (al limite della significatività) e quindi non dovuta al caso.

I laboratori **L000025**, **L000067**, **L000079**, valutando il valore k nella scala di *Landis & Koch*, mostrano una **moderata** concordanza con i risultati attesi del circuito MD 2013, con p-value <0,05 e quindi non dovuta al caso.

Il laboratorio **L000115**, valutando il valore k nella scala di *Landis & Koch*, mostra una **buona** concordanza con i risultati attesi del circuito MD 2013, con p-value <0,05 e quindi non dovuta al caso.

La concordanza mostrata dai laboratori **L000042** e **L000173** con i valori attesi del circuito MD 2013 è puramente casuale (p-value >>0,10).

Tutti gli **altri laboratori** hanno mostrato un'**ottima** concordanza con i valori attesi del circuito MD 2013 con p-value <0,05 e quindi non dovuta al caso.

La concordanza complessiva del circuito MD 2013 è **buona** e non dovuta al caso (p-value <0,05).

12. Sensibilità, specificità e accuratezza.

**Caratteristiche del circuito**  
ricerca *Tylorella equigenitalis*

valore rilevato	Valore assegnato	
	presente	assente
	presente	680
assente	55	705
subtotale	735	720
<b>totale</b>	1455	

specificità	0,98 ± 0,01
sensibilità	0,93 ± 0,02
accuratezza	0,95 ± 0,01

Figura 3: Sensibilità, specificità e accuratezza

**Sensibilità:** capacità d’identificare correttamente i campioni positivi.

La sensibilità nella tabella è data da:  $680/(680+55)$ : dove **680** sono i campioni positivi correttamente identificati, **55** i campioni positivi riportati come negativi dai laboratori partecipanti e  $(680+55)$  **735** i campioni effettivamente positivi distribuiti nel corso degli anni.

**Specificità:** capacità d’identificare correttamente i campioni negativi.

La specificità nella tabella è data da:  $705/(15+705)$ : dove **705** sono i campioni negativi correttamente identificati, **15** sono i campioni negativi riportati come positivi dai laboratori partecipanti e  $(15+705)$  **720** i campioni effettivamente negativi distribuiti nel corso degli anni.

Sensibilità e specificità, sono definite attraverso una proporzione e quindi assumono valori compresi fra 0 e 1.

**Accuratezza:** è il grado di corrispondenza tra il dato atteso e quello effettivamente riscontrato.

L’accuratezza nella tabella è data da:  $(680+705)/1455$ : dove  $(680+705)$  sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati riportati dai laboratori partecipanti e **1455** sono i campioni-prova **totali** distribuiti.

La sensibilità e la specificità del circuito interlaboratorio sono state rispettivamente del 93% e del 98%; l’accuratezza del 95%.

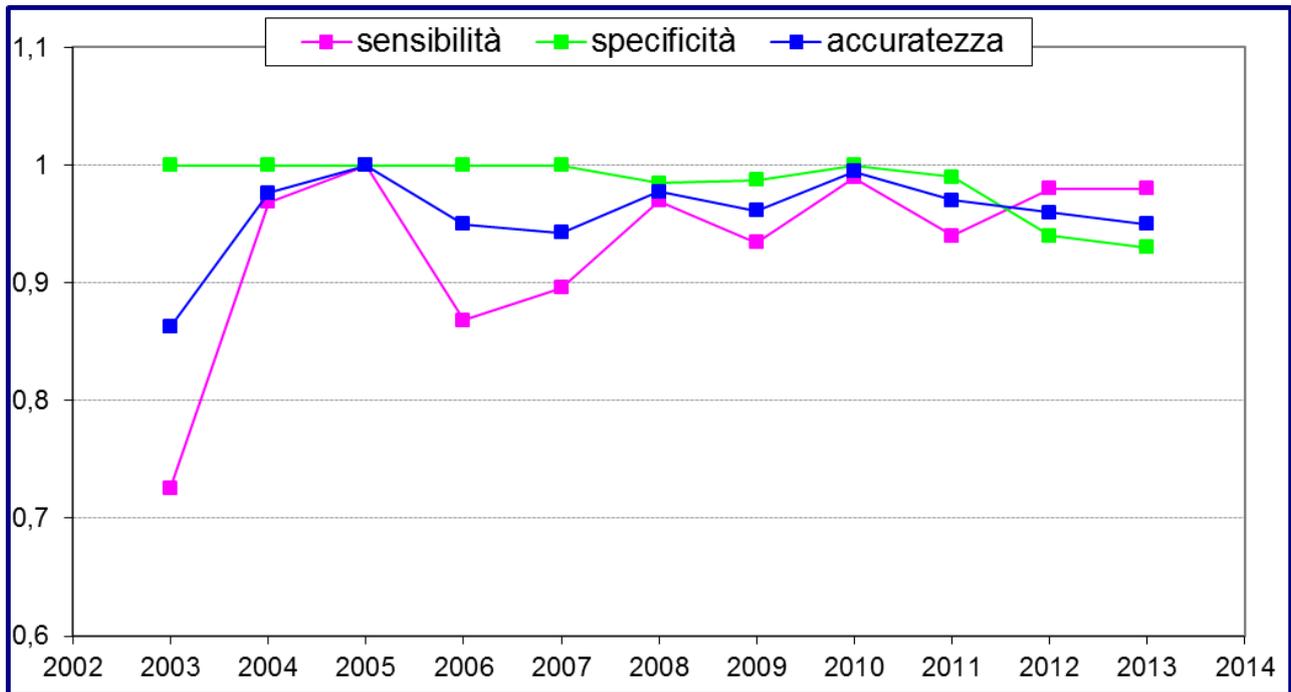


Figura 4: andamento della sensibilità, specificità e accuratezza dal 2003 al 2013

In totale sono stati esaminati n° 1455 campioni prova di cui 735 positivi per *Taylorella equigenitalis* e 720 negativi.

### 13 Altre elaborazioni

Tempistiche inizio prova

Tutti i laboratori hanno dichiarato di avere iniziato l'analisi entro le 48 ore dal prelievo/distribuzione a eccezione di un laboratorio che ha iniziato la prova entro le 72 ore.

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

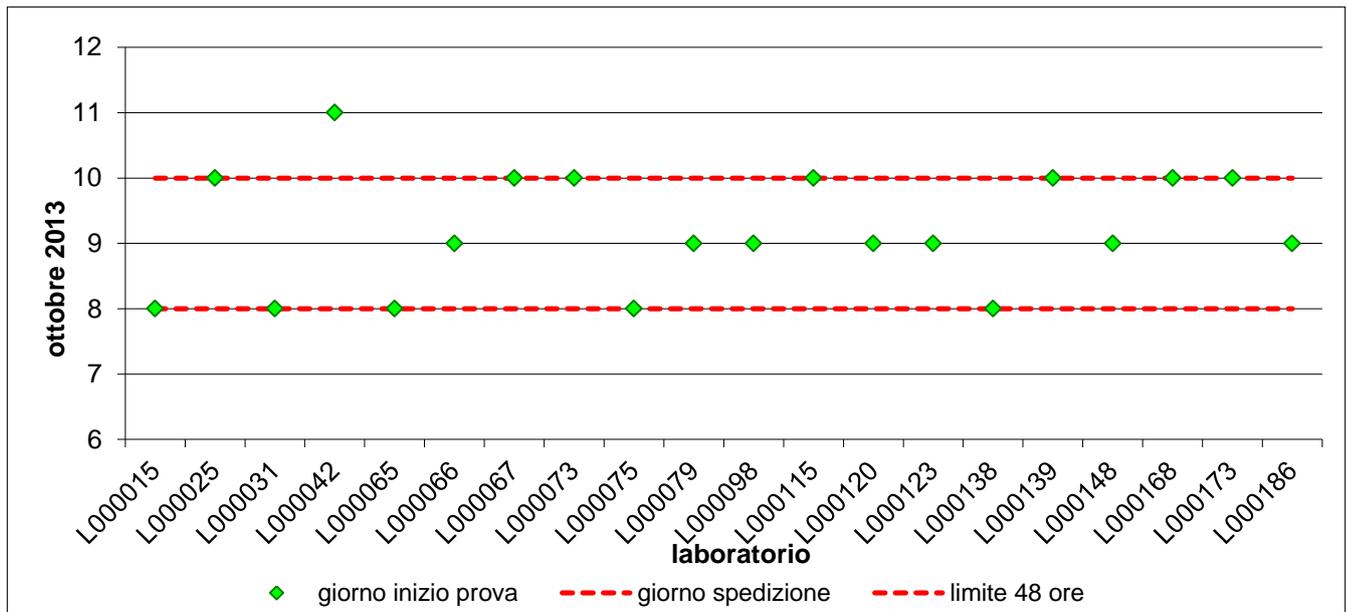


Figura 5: tempistiche di inizio prova da parte dei laboratori partecipanti

### Monitoraggio della temperatura

Abbiamo sperimentato in questa occasione l'utilizzo di micro data logger (FT800) per il monitoraggio della temperatura durante la spedizione, mantenendo tuttavia anche il rilievo manuale della stessa al ricevimento dei campioni prova.

L'utilizzo di tali dispositivi è giustificato dalla necessità di monitorare in continuo le condizioni di conservazione di questi campioni prova, che per le loro caratteristiche sono molto sensibili a variazioni di temperatura.

L'analisi dei dati registrati non ha evidenziato criticità sostanziali, né differenze con i dati rilevati dai laboratori partecipanti e riportati sul sito AQUAWEB: la temperatura di conservazione dei campioni durante la spedizione si è mantenuta nei range indicati ( $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Un laboratorio ha riportato sul sito AQUAWEB una temperatura di  $-10^{\circ}\text{C}$  sul campione in arrivo non confermata dai rilievi del data logger, si ritiene pertanto trattarsi di un errore di digitazione.

### Osservazioni

L'utilizzo delle matrici "tamponi" per la ricerca di *Tylorella equigenitalis* nell'ambito del circuito MD, rappresenta, a nostro avviso, un miglioramento qualitativo importante, perché lo rende maggiormente aderente alle condizioni reali. Tuttavia l'utilizzo di tale matrice e la scelta di proporre, come componente batterica contaminante, selezioni di flora microbica prepuziale, pone nuove problematiche sia per il laboratorio organizzatore, sia per i laboratori partecipanti. Il primo deve garantire la preparazione e spedizione dei campioni prova lo stesso giorno della preparazione e il mantenimento della temperatura di refrigerazione durante il trasporto. La stabilità dei campioni prova è stata garantita, infatti, per tempi molto brevi (72 ore) e, rispetto ai campioni liofilizzati, i tamponi sono più suscettibili alle variazioni esterne, come la temperatura, per tale motivo si è reso necessario valutare l'utilizzo di mini data logger per il suo monitoraggio.

I laboratori partecipanti, da parte loro, sono stati obbligati a iniziare la prova entro 24 ore dal ricevimento e hanno dovuto affrontare campioni prova più complessi e impegnativi con un aumento delle difficoltà d'interpretazione.

### Data report 10/01/2014

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

*SCT 3 - Laboratorio Diagnostica Clinica –Padova  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie  
Viale dell'Università n° 10, 35020 Legnaro (PD)*

*Dr.ssa Michela Corrò*

*☎ (+39) 0498084294*

*Fax (+39) 0498830277*

*✉ e-mail: [mcorro@izsvenezie.it](mailto:mcorro@izsvenezie.it)*

**Allegato al report MD 2013**

**Determinazione LOD (Limit Of Detection).**

1. Introduzione

Per effettuare tale prova si è utilizzato un liofilizzato a concentrazione titolata di  $10^6$  UFC di *Taylorella equigenitalis* e ad ogni laboratorio sono state inviate 9 piastre di terreno CEMO appartenenti tutte allo stesso lotto di produzione, al fine di uniformare le condizioni di prova. I risultati di ogni laboratorio sono stati confrontati con la mediana dei risultati di tutti i laboratori partecipanti.

2. Definizioni

**LOD (Limit Of Detection):** inteso come la più alta diluizione seriale del campione prova in cui è ancora possibile rilevare la presenza di *Taylorella equigenitalis*.

**Percentile:** definito come il valore che divide una serie ordinata di osservazioni in 100 parti uguali, per esempio un percentile di ordine  $\alpha$ , è il valore Q che divide la popolazione in due parti proporzionali ad  $\alpha$  e  $(1-\alpha)$ , caratterizzate da valori rispettivamente minori e maggiori di Q.

**Mediana:** è il valore centrale che lascia a destra e a sinistra (o sopra e sotto) il 50% delle osservazioni.

3. Indicazioni generali

3.1 Composizione del liofilizzato

Identificativo	Contenuto
LOD	<i>Taylorella equigenitalis</i> ceppo di campo 15/L13

3.2 Preparazione e semina del campione

- Aggiungere al campione liofilizzato 2,0 ml di brodo nutriente sterile (soluzione madre 1:1).
- Lasciare il campione a temperatura ambiente per 5-10 minuti.
- Mescolare accuratamente fino a completa solubilizzazione.
- Preparare diluizioni seriali in base 10.
- Seminare 100  $\mu$ l di ogni diluizione da  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  nelle piastre di CEMO agar.
- Procedere come previsto dalla procedura per la ricerca *Taylorella equigenitalis*.

4. Risultati

Laboratorio	L000015	L000025	L000031	L000042	L000065	L000066	L000067	L000073	L000075	L000079
LOD	$2 \times 10^9$	$2 \times 10^4$	$8 \times 10^4$	$12 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^9$	$2 \times 10^7$	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^5$

Laboratorio	L000098	L000115	L000120	L000123	L000138	L000139	L000148	L000168	L000173	L000186
LOD	$1 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$10 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$76 \times 10^3$	$2 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$

## 5. Analisi statistica dei dati

### 5.1 Elaborazione statistica

Per l'elaborazione dei risultati si sono utilizzati i seguenti parametri:

**mediana**, definita come il valore che occupa la posizione centrale delle osservazioni disposte in ordine crescente, è utilizzata come parametro di confronto per la sua robustezza (linea blu);

**percentile**, definito come il valore che divide una serie ordinata di osservazioni in 100 parti uguali; nel nostro caso si è scelto il 5° e il 95° percentile, utilizzati per individuare l'intervallo all'interno del quale ricade il 90% delle osservazioni dei laboratori partecipanti (tratteggio rosso);

**coefficiente di variazione (CV)**, definito come il rapporto percentuale tra la deviazione standard e la media delle osservazioni, è un numero puro che fornisce un'indicazione della variabilità delle osservazioni rilevate.

Parametri	Log <sub>10</sub> .LOD
N° laboratori	20
Mediana	5,30
5° percentile	4,30
95° percentile	9,02
Deviazione standard	1,36
Media	5,62
Coefficiente di variazione (CV)	24,29

### 5.2 Rappresentazione grafica dei risultati (figura 1 e 2)

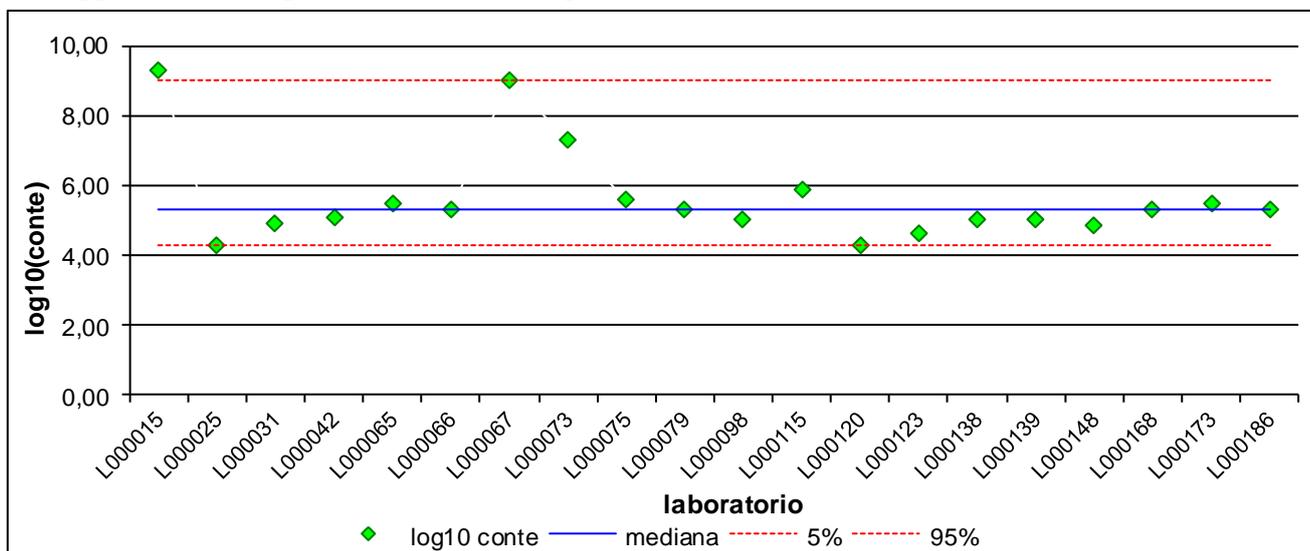


Figura 1: risultati dei laboratori partecipanti espressi con log<sub>10</sub>

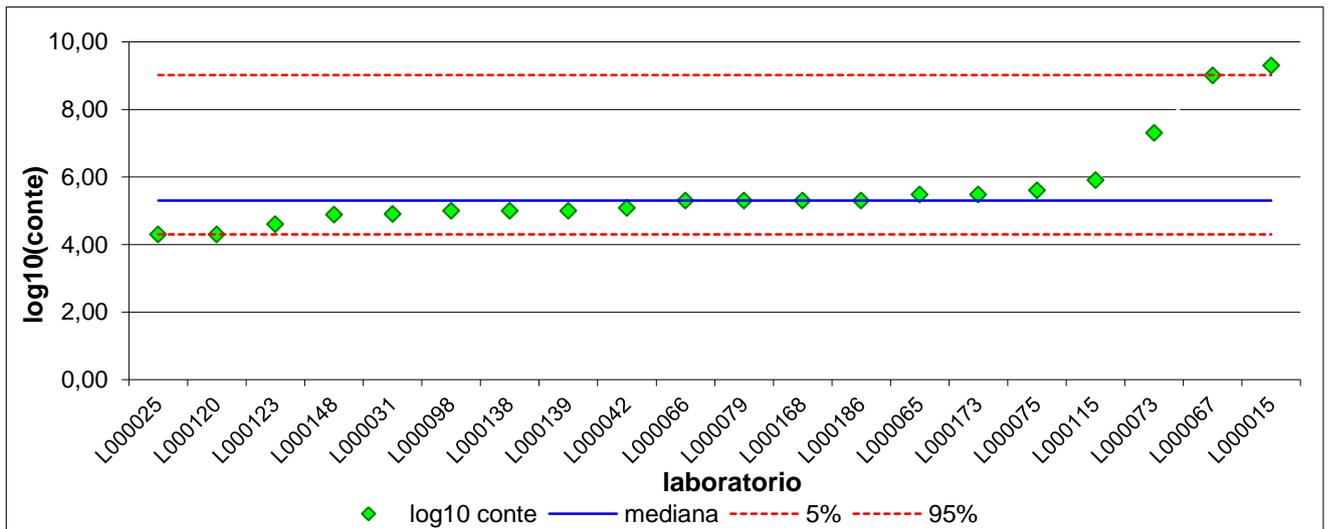


Figura 2: risultati ordinati in funzione della grandezza, espressi con  $\log_{10}$

## 6. Caratteristiche del campione prova

Si riporta di seguito l'elaborazione statistica dei dati con il relativo grafico (figura 3) delle prove di ripetibilità eseguite sul campione prova utilizzato per la determinazione del LOD

Parametri	Log <sub>10</sub> .LOD
N° repliche	5
Mediana	4,9
5° percentile	4,36
95° percentile	5,24
Deviazione standard	0,38
Media	4,82
Coefficiente di variazione (CV)	7,94%

### 6.1 Rappresentazione grafica dei risultati

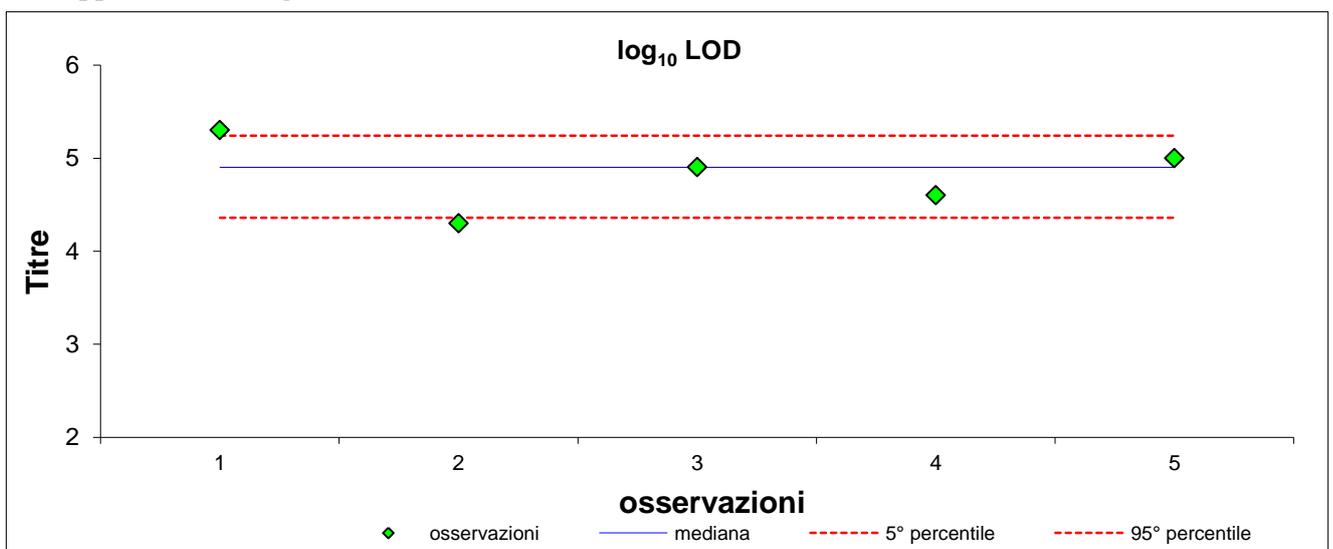


Figura 3: risultati delle 5 repliche (ripetibilità) eseguite sul campione prova, espressi con  $\log_{10}$

### 7. Discussione

#### **Osservazioni e discussione**

Come si può notare dai dati sopra riportati (figura 1 e 2), i laboratori L000015 e L000067 tendono a sovrastimare il LOD, mentre i laboratori L000025 e L000120 a sottostimarli.

Il basso valore del coefficiente di variazione (CV), pari a  $CV = 7,94\%$ , calcolato per le prove eseguite dal laboratorio organizzatore (figura 3), indicano una limitata variabilità dei risultati rispetto al valore medio e quindi una buona ripetibilità del campione prova.

Il coefficiente di variazione calcolato per le prove eseguite dai laboratori partecipanti pari a  $CV = 24.29\%$  risulta più elevato del precedente indicatore si tratta comunque di una dispersione non elevata dei risultati attorno alla media che porta a considerare accettabile la riproducibilità tra i laboratori.