

# Risultati Circuito MD 2012

## Schema Microbiologia Diagnostica

---

**Circuito Interlaboratorio AQUA**  
**Distribuzione Microbiologia Diagnostica**

Ricerca di: *Taylorella equigenitalis*

ANNO 2012

## 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 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 per l'analisi dei campioni.

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 liofilizzati 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 dopo dieci giorni, a garanzia della stabilità dei liofilizzati 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 Kappa di Cohen (K) che permette di valutare il grado di concordanza tra risultati ottenuti e risultati attesi.

## 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 MD 2012

Campioni prova	Composizione
A/12	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184
B/12	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC 29428
C/12	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC 29428
D/12	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617; <i>Rhodococcus equi</i> ATCC6939
E/12	Sterile
F/12	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; <i>Candida tropicalis</i> 3636/P07
G/12	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212; <i>Candida tropicalis</i> 3636/P07
H/12	Flora microbica da prepuzio di equino I
I/12	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; Flora microbica da prepuzio di equino I
L/12	Flora microbica da prepuzio di equino II

## 4. Indicazioni generali

### 4.1 Raccomandazioni

- Inizio prova entro 10 giorni dalla data di distribuzione

### 4.2 Preparazione del campione

- Aggiungere al campione liofilizzato 2,0 ml di brodo nutriente sterile.
- Lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti.
- Mescolare accuratamente fino a completa solubilizzazione.
- Seminare i terreni culturali
- Ulteriori indicazioni per la manipolazione dei campioni prova sono riportate nella scheda di sicurezza del circuito AQUA: Schema Microbiologia Diagnostica

## 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 Kappa 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:

K	Riproducibilità
≤ 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 Dr.ssa Michela Corrò

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

Responsabile tecnico Sig.ra Silvia Friso

e-mail [sfriso@izsvenezie.it](mailto:sfriso@izsvenezie.it)

Responsabile statistico Dr.ssa Marzia Mancin

e-mail [crev.mmancin@izsvenezie.it](mailto:crev.mmancin@izsvenezie.it)

Assicuratore Qualità Dr Luciano Iob

e-mail [liob@izsvenezie.it](mailto:liob@izsvenezie.it)

9. Laboratori partecipanti

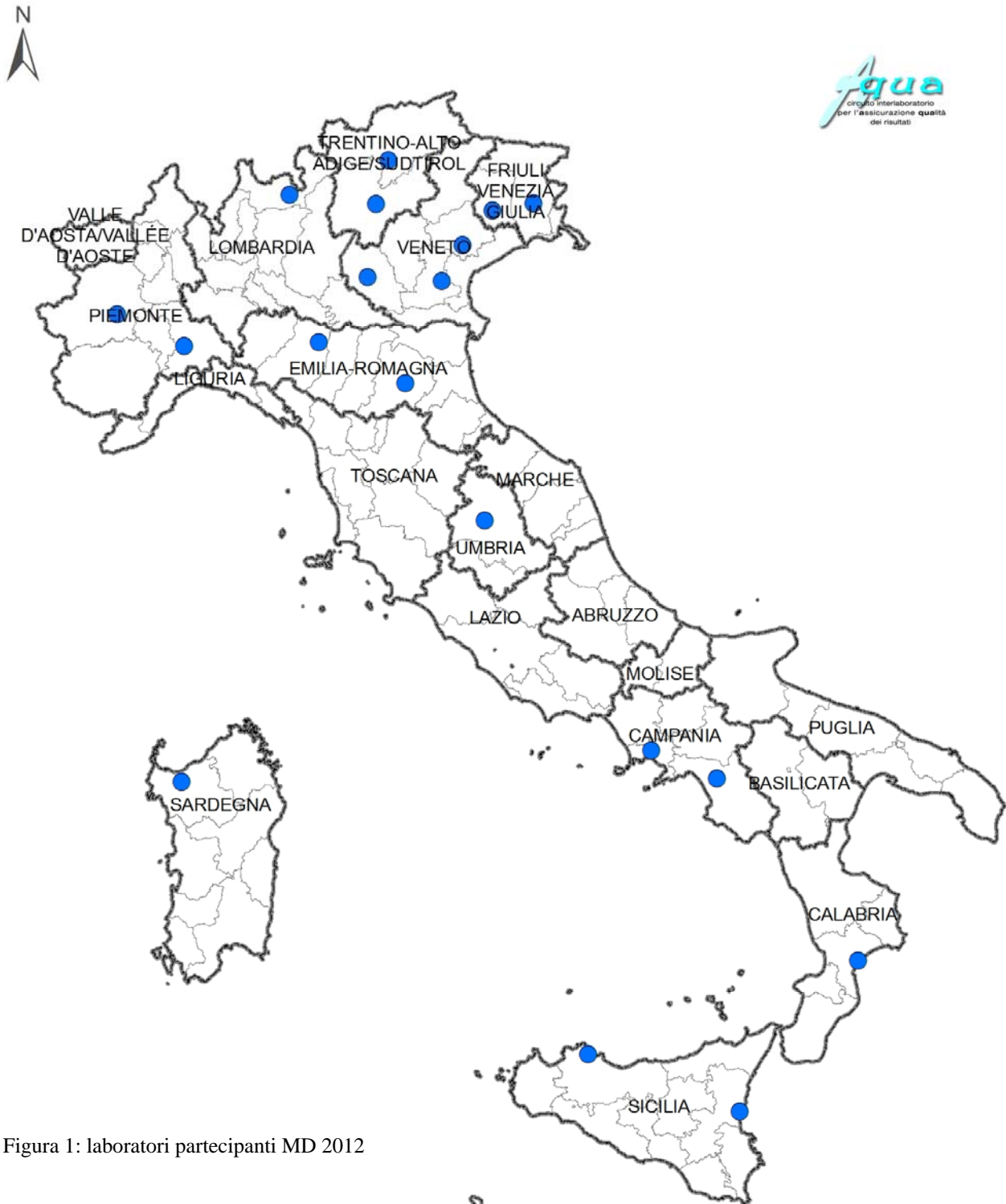


Figura 1: laboratori partecipanti MD 2012

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

### 10. Risultati

#### 10.1 Risultati attesi e risultati dei laboratori partecipante

<b>CIRCUITO INTERLABORATORIO MD 2012</b>										
<b>Codice Identificativo</b>	<b>A/12</b>	<b>B/12</b>	<b>C/12</b>	<b>D/12</b>	<b>E/12</b>	<b>F/12</b>	<b>G/12</b>	<b>H/12</b>	<b>I/12</b>	<b>L/12</b>
<b>Risultato atteso</b>	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000015	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000025	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
L000042	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
L000065	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000066	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000067	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
L000069	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000072	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
L000073	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
L000075	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
L000079	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000098	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000115	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000120	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
L000123	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
L000138	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000148	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000150	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L000151	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
<b>corretto/totale</b>	18/19	19/19	18/19	18/19	19/19	16/19	17/19	18/19	18/19	14/19

10.2 Statistica K di Cohen

Si riporta di seguito il calcolo della statistica K per laboratorio partecipante e del K complessivo

. Calcolo del valore k sul laboratorio L000015

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

. Calcolo del valore k sul laboratorio L000025

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	54.00%	0.7826	0.3087	2.54	0.0056

. Calcolo del valore k sul laboratorio L000042

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	50.00%	0.8000	0.3098	2.58	0.0049

. Calcolo del valore k sul laboratorio L000065

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

. Calcolo del valore k sul laboratorio L000066

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

. Calcolo del valore k sul laboratorio L000067

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	50.00%	0.8000	0.3098	2.58	0.0049



## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000069

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000072

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
40.00%	52.00%	-0.2500	0.3162	-0.79	0.7854

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000073

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
70.00%	50.00%	0.4000	0.3098	1.29	0.0984

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000075

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	50.00%	0.8000	0.3098	2.58	0.0049

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000079

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000098

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	1.0000	0.3162	3.16	0.0008

### . Calcolo del valore k sul laboratorio L000115

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

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

100.00%      52.00%      **1.0000**      0.3162      3.16      **0.0008**

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000120**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	50.00%	<b>0.8000</b>	0.3098	2.58	<b>0.0049</b>

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

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
90.00%	54.00%	<b>0.7826</b>	0.3087	2.54	<b>0.0056</b>

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

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	<b>1.0000</b>	0.3162	3.16	<b>0.0008</b>

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

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	<b>1.0000</b>	0.3162	3.16	<b>0.0008</b>

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000150**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	<b>1.0000</b>	0.3162	3.16	<b>0.0008</b>

**. Calcolo del valore k sul laboratorio L000151**

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
100.00%	52.00%	<b>1.0000</b>	0.3162	3.16	<b>0.0008</b>

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

### KAPPA COMPLESSIVO

. Calcolo del valore k su tutti i laboratori

Kappa	Z	Prob>Z
0.7087	29.31	0.0000

(Leggenda: Agreement = accordo osservato; Expected = accordo atteso; kappa = statistica kappa 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	L000042	L000065	L000066
<b>kappa</b>	1,0000	0,7826	0,8000	1,0000	1,0000
<b>p-value</b>	0,0008	0,0056	0,0049	0,0008	0,0008

Laboratorio	L000067	L000069	L000072	L000073	L000075
<b>kappa</b>	0,8000	1,0000	-0,2500	0,4000	0,8000
<b>p-value</b>	0,0049	0,0008	0,7854	0,0984	0,0049

Laboratorio	L000079	L000098	L000115	L000120	L000123
<b>kappa</b>	1,0000	1,0000	1,0000	0,8000	0,7826
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0049	0,0056

Laboratorio	L000138	L000148	L000150	L000151	Complessivo
<b>kappa</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7472
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000

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

11.Circuito interlaboratorio MD 2012: conclusioni e osservazioni

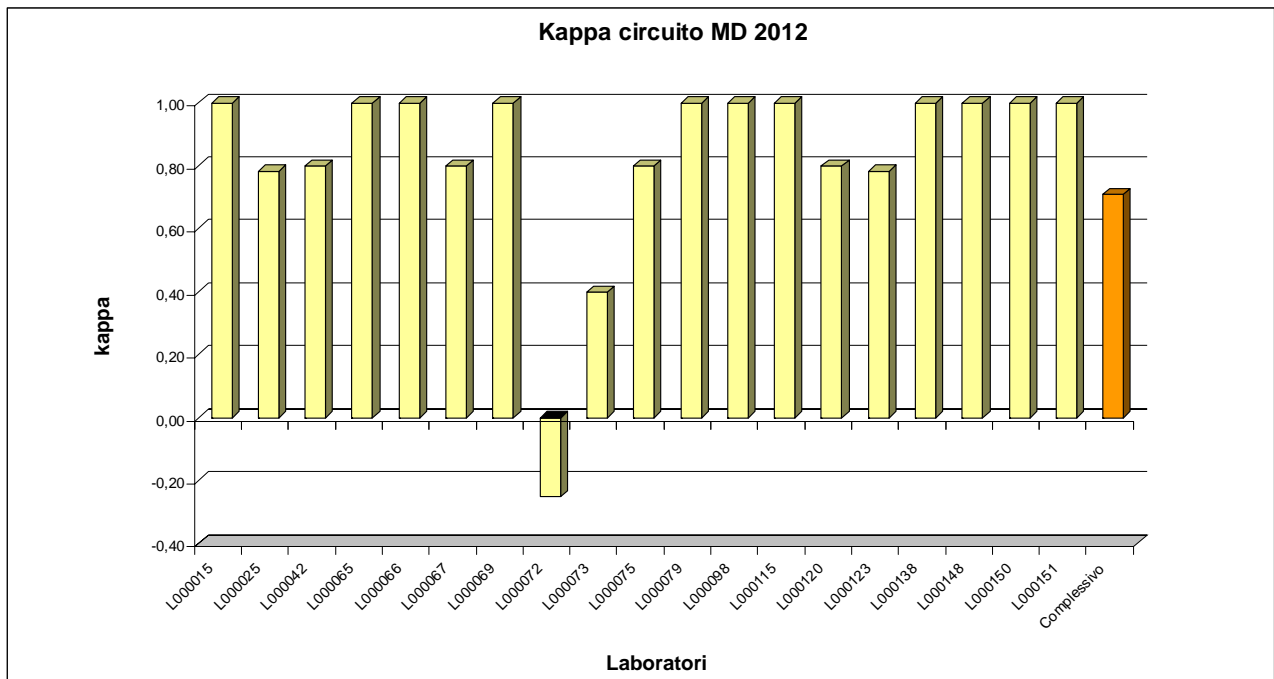


Figura 2: valori di Kappa dei laboratori partecipanti e Kappa complessivo MD 2012

I laboratori **L000025**, **L000042**, **L000067**, **L000075**, **L000120**, **L000123**, valutando il valore k nella scala di *Landis & Koch* (tabella riportata sopra), mostrano una **buona** concordanza con i risultati attesi del circuito MD 2012, con un p-value <0,05 e quindi non dovuta al caso.

Il laboratorio **L00073** mostra una **discreta** concordanza con i valori attesi del circuito MD 2012 al limite della significatività (p-value <0,10).

La concordanza mostrata dal laboratorio **L00072** con i valori attesi del circuito MD 2012 è puramente casuale (p-value >>0,10).

Tutti gli **altri laboratori** hanno mostrato un'**ottima** concordanza con i valori attesi del circuito MD 2012 con p-value <0,05 e quindi non dovuta al caso.

La concordanza complessiva del circuito MD 2012 è **buona** e non dovuta al caso (p-value <0,05).

12. Sensibilità, specificità e accuratezza.

Caratteristiche del circuito ricerca <i>Taylorella equigenitalis</i>			
valore rilevato	Valore assegnato		
	presente	assente	
presente	579	14	
assente	36	646	
subtotale	615	660	
totale	1275		

specificità	0,98 ± 0,01
sensibilità	0,94 ± 0,02
accuratezza	0,96 ± 0,01

Figura 3: Sensibilità, specificità e accuratezza

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

La sensibilità nella tabella è data da  $579/(579+36)$ : dove 579 sono i campioni positivi correttamente identificati, 36 i campioni positivi riportati come negativi dai laboratori partecipanti e  $(579+36)$  **615** i campioni effettivamente positivi distribuiti nel corso degli anni.

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

La specificità nella tabella è data da  $646/(14+646)$ : dove 646 sono i campioni negativi correttamente identificati, 14 sono i campioni negativi riportati come positivi dai laboratori partecipanti e  $(14+646)$  **660** 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  $(579+646)/1275$ : dove  $(579+646)$  sono rispettivamente i campioni positivi e negativi **correttamente** identificati riportati dai laboratori partecipanti e **1275**, sono i campioni-prova **totali** distribuiti.

La sensibilità e la specificità del circuito interlaboratorio sono state rispettivamente del 94% e del 98%; l’accuratezza del 96%.

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

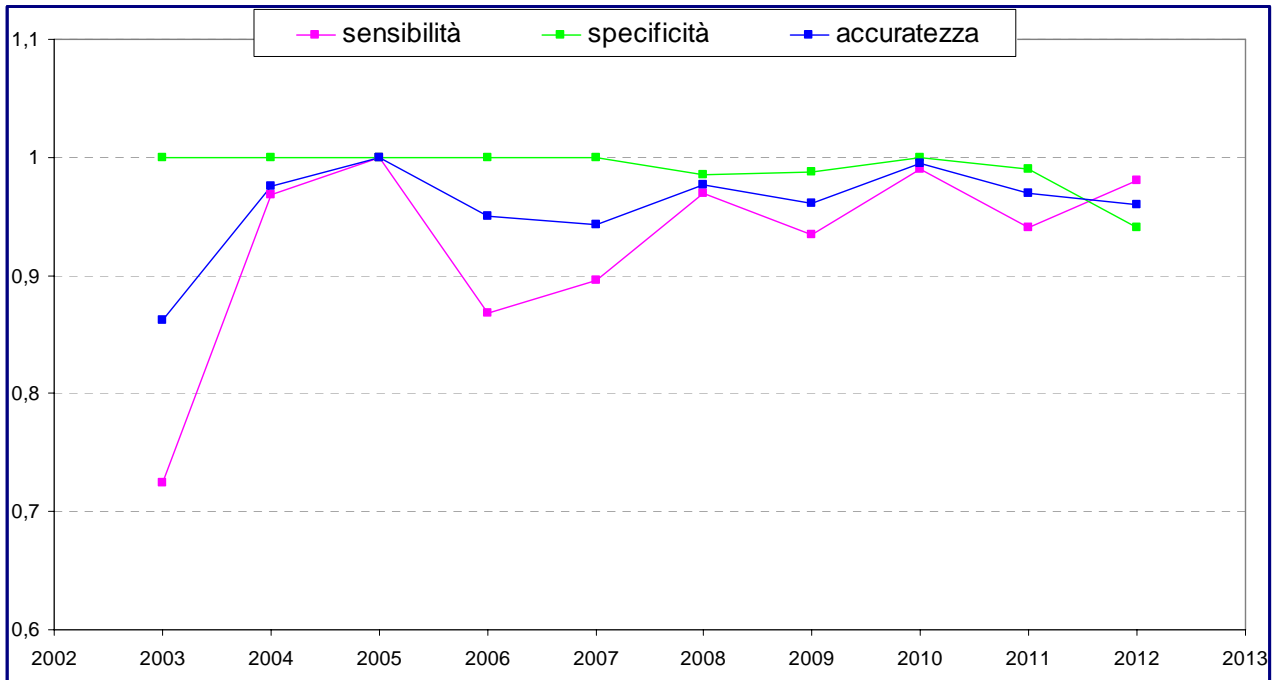


Figura 4: andamento della sensibilità, specificità e accuratezza dal 2003 al 2012

In totale sono stati esaminati n° 1275 campioni prova di cui 615 positivi per *Taylorella equigenitalis* e 660 negativi.

**Data 10/01/2013**

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 2012**

**Prova sperimentale su matrice “tamponi”**

**1. Introduzione**

Come attività sperimentale ci siamo proposti di valutare la matrice “tamponi”, preparata con flora microbica prepuziale addizionata o meno a *Taylorella equigenitalis*, con lo scopo di proporre un campione prova con caratteristiche maggiormente aderenti alle condizioni reali di campionamento. In questo modo si potranno esaminare sia le attività riguardanti l’isolamento e l’identificazione del patogeno, sia le problematiche connesse con le modalità di conservazione e i tempi di consegna dei tamponi al laboratorio.

**2. Indicazioni generali**

2.1 Le fasi principali per l’allestimento della matrice “tamponi” si possono così riassumere:

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;
3. Preparazione delle sospensioni di flora microbica con concentrazioni diverse di *T. equigenitalis* per verificarne la stabilità, valutare la crescita in piastra dei diversi ceppi e scegliere le combinazioni batteriche in grado di garantire la presenza nella matrice “tamponi” di un numero sufficiente di colonie di *T. equigenitalis* da poter essere evidenziate tra la flora microbica competitiva. Per i campioni positivi si è deciso di utilizzare il ceppo di riferimento di *T. equigenitalis* (NCTC 11184) che meglio evidenzia le caratteristiche tipiche di specie rispetto alla variabilità di un ceppo di campo.
4. Allestimento delle matrici “tamponi” mediante breve immersione fino a imbibizione del tampone nelle sospensioni batteriche selezionate; inserimento del tampone nella provetta contenente terreno di Stuart con carbone.
5. 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 dei tamponi.

Un problema fondamentale da risolvere è stato quello di far giungere i tamponi ai laboratori partecipanti entro 48 ore dal momento della loro preparazione (identificabile con la data di prelievo in condizioni reali), come previsto nelle indicazioni OIE.

6. Si è proceduto alla preparazione dei campioni la mattina stessa della spedizione con corriere in modo da garantire la consegna al laboratorio entro le 48 ore.
7. I laboratori partecipanti sono stati avvisati in anticipo della data di spedizione e delle condizioni particolari richieste per la presa in carico dei campioni e l’esecuzione delle analisi.
8. Ai laboratori partecipanti è stato inoltre chiesto di:
  - rilevare la temperatura dei campioni all’arrivo (campione d’appoggio nella confezione)

## Circuito Interlaboratorio AQUA – Schema Microbiologia Diagnostica

- segnalare immediatamente al laboratorio organizzatore il mancato ricevimento dei campioni entro le 48 ore dalla data di spedizione
- segnalare eventuali anomalie nell'involucro o nei campioni.

### 2.1 Composizione delle matrici “tampone”

Campioni prova	Composizione
Tampone 1	<i>Taylorella equigenitalis</i> NCTC 11184; flora microbica da prepuzio di equino I (stessa composizione liofilizzato I/12)
Tampone 2	Flora microbica da prepuzio di equino II (stessa composizione liofilizzato L/12)
Tampone 3	<i>Taylorella asinigenitalis</i> ; Flora microbica da prepuzio di equino III

### 2.2 gestione e semina dei tamponi

Semina dei campioni sperimentali entro 48 ore dalla data di distribuzione (intesa come data del prelievo).

Utilizzo delle procedure di prova in uso presso il laboratorio.

## 3. Risultati

### 3.1 Risultati attesi e risultati dei laboratori partecipanti

MD 2012 prova sperimentale			
Codice Identificativo	Tampone 1	Tampone 2	Tampone 3
<b>Risultato atteso</b>	+	-	-
<b>Codice Identificativo laboratorio</b>			
L000000	-	-	-
L000015	+	-	-
L000025	+	-	+
L000042	-	-	+
L000065	+	-	-
L000066	+	-	-
L000067	+	-	+
L000069	+	-	-
L000072	+	+	+
L000073	-	+	+
L000075	+	-	+
L000079	-	-	+
L000098	+	-	-
L000115	-	-	-
L000120	-	-	-
L000123	-	+	+
L000138	+	-	+
L000148	+	-	-
L000150	-	-	+
L000151	+	-	-
<b>Corretto/totale</b>	12/20	17/20	10/20

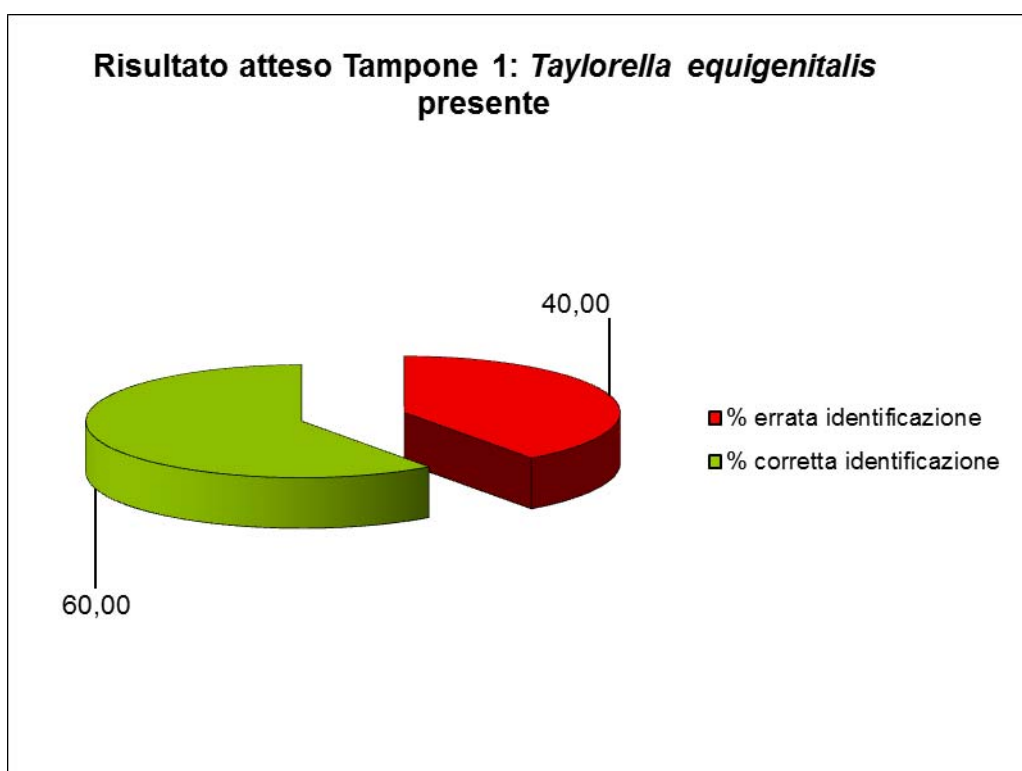
Note: alla prova sperimentale hanno partecipato in totale 20 laboratori



3.2 Risultati per singolo tampone

**Tampone 1**

Risultato atteso	% errata identificazione	% corretta identificazione	totale
presente	8	12	20
	40,00	60,00	100,00



**Considerazioni e commenti**

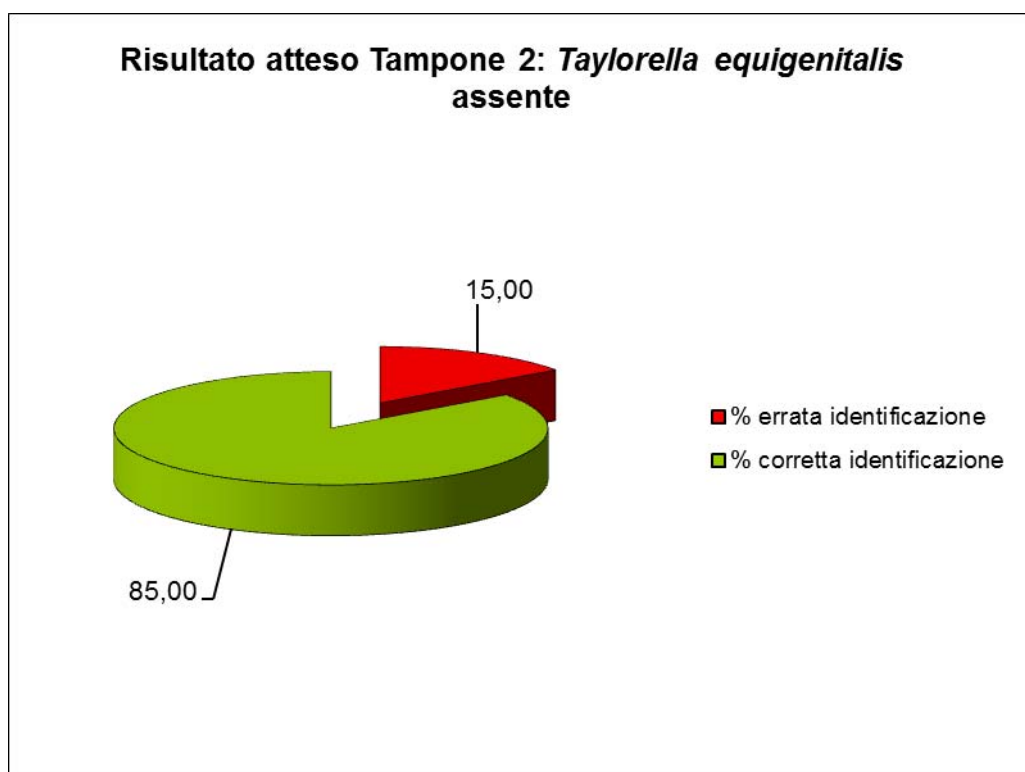
Il 60% dei laboratori ha evidenziato correttamente la presenza di *T. equigenitalis* nel tampone 1, tuttavia otto laboratori non hanno rilevato il patogeno (40%) .

La composizione microbica del tampone, flora microbica prepuziale addizionata con *T. equigenitalis*, è la stessa del liofilizzato I/12, campione prova valutato correttamente da 18 laboratori su 19.

Senza dubbio la tipologia della matrice ha una grossa influenza sulla qualità dei campioni prova, un buon liofilizzato, ha il vantaggio di essere stabile a lungo e di risentire scarsamente di variazioni esterne. I tamponi sono in grado di mantenere condizioni di stasi batterica per tempi limitati e nel caso particolare di *T. equigenitalis* è necessario associare condizioni di temperatura costante e controllata ( $4^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), in quanto il microrganismo è particolarmente sensibile a variazioni improvvise della stessa.

**Tampone 2**

Risultato atteso	% errata identificazione	% corretta identificazione	totale
assente	3	17	20
	15,00	85,00	100,00



**Considerazioni e commenti**

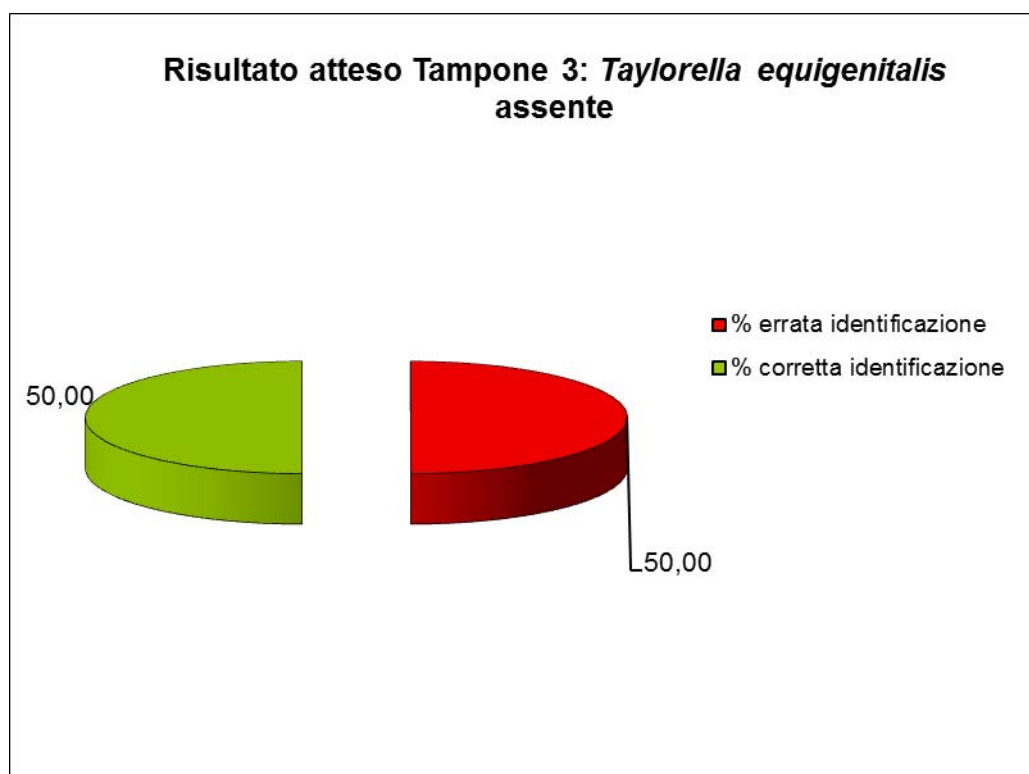
La composizione microbica del tampone 2, costituita da flora microbica prepuziale, è la stessa del liofilizzato L/12. Sorprende un po' che 3 laboratori (il 15% ) abbiano indicato la presenza di *T. equigenitalis* in realtà non presente nel campione. Tuttavia anche il liofilizzato corrispondente del circuito ha creato qualche problema interpretativo, perché 5 laboratori (2 dei quali hanno considerato positivo anche i tamponi) hanno indicato positività per *T. equigenitalis*.

Il problema a nostro parere è dovuto alla presenza tra i batteri della flora microbica di *Uligella uretralis* che, come segnalato anche dal manuale OIE, presenta alcune caratteristiche simili al patogeno e può essere con questo confusa: ossidasi positiva, catalasi positiva, morfologia delle colonie simile, fosfatasi alcalina positiva anche se necessita di tempi più lunghi rispetto a quelli previsti per *T. equigenitalis* e con reazione meno intensa; caratteristiche differenziali sono la crescita in aerofilia e la prova di agglutinazione con antisiero specifico per *T. equigenitalis* negativa.

Il tampone 2 in ogni caso è quello risultato meno problematico perché l'85% dei laboratori ha risposto correttamente.

**Tampone 3**

Risultato atteso	% errata identificazione	% corretta identificazione	totale
Assente	10	10	20
	50,00	50,00	100,00



**Considerazioni e commenti**

Si tratta senza dubbio del tampone che ha dato il maggior numero di problemi interpretativi, per altro attesi, perché è stato addizionato alla flora prepuziale di cavallo un ceppo di campo di *T. asinigenitalis*, difficilmente distinguibile fenotipicamente da *T. equigenitalis* a meno di avere una buona conoscenza di queste specie, oppure di disporre di una metodica di biologia molecolare in grado di differenziarle. In questo caso, pertanto, era lecito avanzare un sospetto di presenza del patogeno, tuttavia l'esecuzione in doppio delle prove biochimiche previste con il ceppo di riferimento di *T. equigenitalis* avrebbe permesso di evidenziare due aspetti principali:

fosfatasi alcalina più lenta

prova di agglutinazione, effettuata con l'antisiero specifico, caratterizzata da una

flocculazione anomala, grossolana completamente diversa da quella *T. equigenitalis*

Abbiamo voluto preparare un campione con *T. asinigenitalis*, perché ci è capitato di isolarla, nel corso degli anni, da alcuni tamponi prepuziali di asini stalloni e di un mulo e per far conoscere questa specie a quanti non l'avessero ancora isolata: ci è sembrato un ottimo esempio didattico.

#### 4. Analisi delle variabili o punti critici

##### 4.1 Tempi di consegna e inizio analisi

Diciannove laboratori hanno ricevuto i tamponi entro 48 ore dall'invio, un laboratorio li ha ricevuti entro 72 ore, e ha iniziato la prova lo stesso giorno dell'arrivo. Tre laboratori, tra i quali quello che ha ricevuto i campioni in ritardo, hanno iniziato le prove con un giorno di ritardo, tuttavia disponevano ancora di campioni con caratteristiche conservate, come garantito dalle prove di stabilità e omogeneità effettuate. Un laboratorio ha avviato la prova dopo 6 giorni dalla data di spedizione, quindi con campioni ormai già alterati.

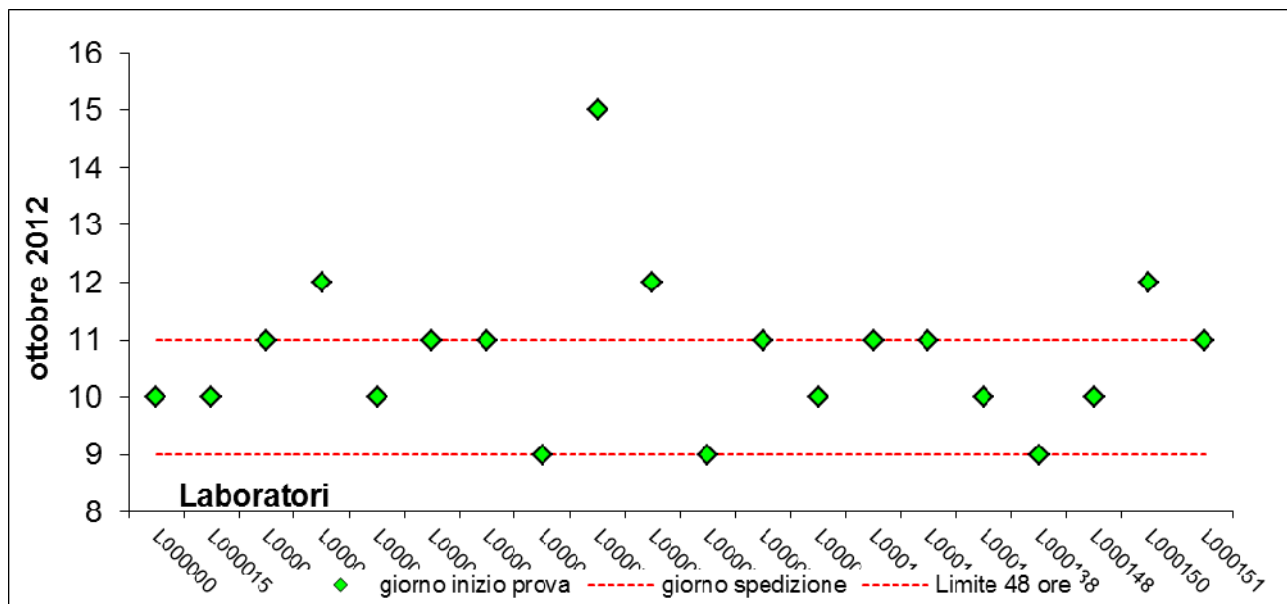


Figura 1: date inizio prova nei laboratori partecipanti

##### 4.2 Temperatura di trasporto dei campioni

Le condizioni di conservazione dei tamponi dal momento della spedizione sino all'arrivo in laboratorio sono una fase molto delicata, poiché tale matrice è più sensibile alle variazioni di temperatura rispetto a un campione liofilizzato. Il mantenimento della temperatura di refrigerazione è pertanto uno dei punti critici da monitorare perché può condizionare in maniera pesante la qualità del campione prova.

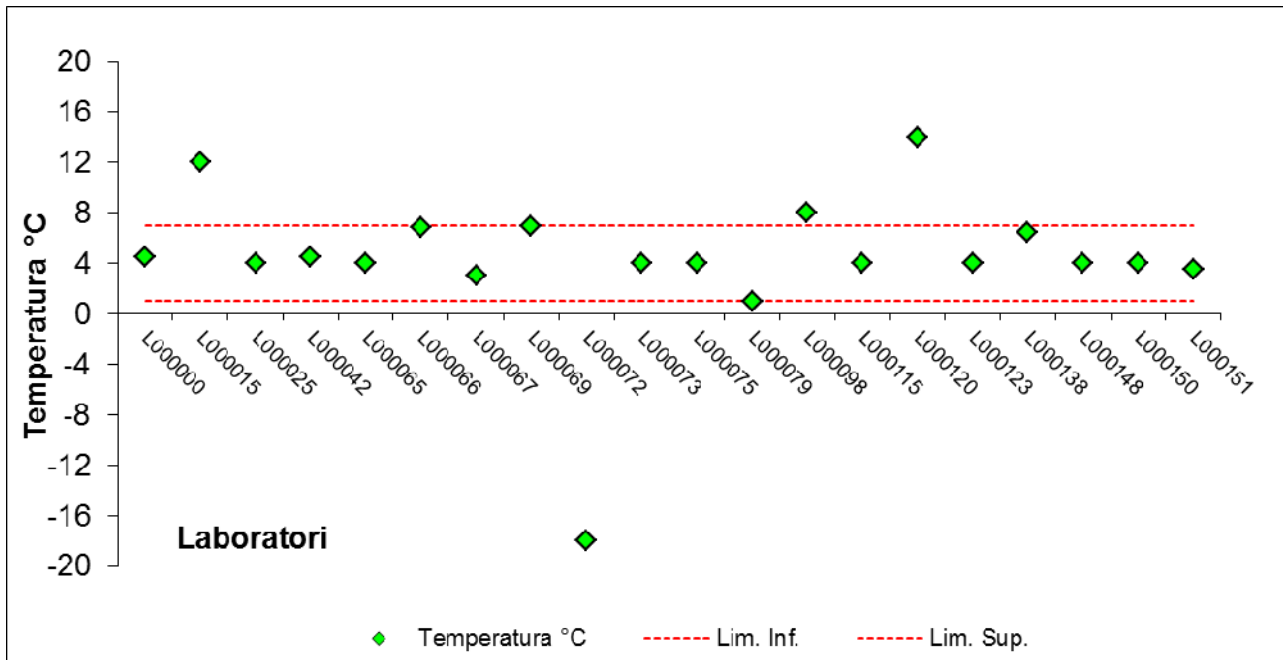


Figura 2: temperature rilevate all'arrivo dei tamponi

#### 4.3 Metodo di prova

Tutti i laboratori hanno utilizzato il manuale OIE come riferimento per il metodo di prova.

#### 4.4 Terreno utilizzato per l'isolamento

Dall'esperienza fatta in fase di preparazione del circuito e della parte sperimentale (controlli di crescita, omogeneità e stabilità), emerge un altro punto critico importante, non valutato però in questa prova sperimentale, rappresentato dalla variabilità dei lotti di terreno, che noi abbiamo osservato per il terreno CEMO prodotto presso il nostro Istituto. Tale aspetto sarà da prendere in considerazione e da valutare nelle prossime prove interlaboratorio. Perché una differente selettività del terreno incide in maniera importante sulla possibilità di mettere in evidenza la presenza del patogeno se in bassa carica.

### 5. Osservazioni e discussione

L'utilizzo delle matrici "tampone" per la ricerca di *Taylorella equigenitalis* nell'ambito del circuito di Microbiologia Diagnostica, rappresenta, a nostro avviso, un miglioramento qualitativo importante, perché lo rende maggiormente aderente alla realtà. Tuttavia l'utilizzo della matrice "tampone" e la scelta di proporre selezioni di flora microbica prepuziale, pongono nuove problematiche per il laboratorio organizzatore, in fase di preparazione e spedizione dei campioni prova, per garantire la vitalità della componente microbica. La stabilità di tali campioni si riduce infatti a tempi molto brevi e, inoltre, sono particolarmente suscettibili, rispetto ai campioni liofilizzati, alle variazioni esterne, ad esempio della temperatura durante il trasporto. Ma pone problemi anche per i laboratori partecipanti obbligati al rispetto di tempi brevi per l'inizio delle prove e ad affrontare campioni prova che per le loro caratteristiche risultano di più "difficile" interpretazione, come evidenziato in alcune osservazioni e nei commenti inviatici, su nostra richiesta, dai colleghi che hanno partecipato alla prova sperimentale.