

Ottobre 2015

Risultati Circuito 1-14
Schema diagnostica bovina e suina
mediante tecniche biomolecolari

**Report del circuito interlaboratorio di diagnostica bovina e suina
mediante tecniche biomolecolari**

Distribuzione 1/2014

**Ente organizzatore:
Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie
Viale dell'Università, 10
35020 Legnaro (PD)**

Coordinatore del proficiency test: Dr. Stefano Nardelli
snardelli@izsvenezie.it
049/8084358

Esperto tecnico: Dr.ssa Letizia Ceglie
lceglie@izsvenezie.it

Esperto statistico: Dr.ssa Marzia Mancin
mmancin@izsvenezie.it

PIANIFICAZIONE DEL CIRCUITO

Questo report contiene i risultati del circuito interlaboratorio, organizzato nell'ambito del Circuito Aqua, dal Laboratorio di Virologia Diagnostica (SCT3), con la finalità di verificare le performance relative a metodiche biomolecolari impiegate per la diagnosi di malattie che colpiscono le specie bovina e suina e per le quali sono state ufficializzate negli anni passati a partire dal 2006 le procedure di prova (PdP) seguenti e successive revisioni:

- Rilevazione dell'RNA del virus BVD-MD, responsabile della diarrea virale bovina – malattia delle mucose mediante RT-PCR (regione conservata localizzata in 5'UTR).
- Rilevazione del DNA del virus della rinotracheite infettiva del bovino (BHV-1) mediante PCR (gene UL30).
- Rilevazione del DNA di *Neospora caninum* mediante PCR (regione conservata del gene codificante per la subunità piccola 18S del rRNA).
- Rilevazione dell'RNA del virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV) mediante RT-PCR (ORF 7).
- Rilevazione di DNA di *Coxiella burnetii* mediante Real-time PCR (*IS1111*).
- Rilevazione di DNA di circovirus suino di tipo 2 mediante PCR end-point

Sono state sottoposte a *ring test* analisi adottate negli ultimi anni nella *routine* del Laboratorio di Virologia Diagnostica di questo Istituto per diagnosi virologiche e, in un caso, batteriologica e parassitologica. Dal momento che tali indagini sono effettuate con metodiche biomolecolari (RT-PCR e PCR), presso tutte le U.O. di biologia molecolare dislocate sul territorio di competenza dell'Istituto, questo circuito interlaboratorio è stato proposto ai laboratori delle sezioni territoriali al fine di confrontare la riproducibilità interlaboratorio e garantire un'uniformità nei risultati. Al circuito partecipano anche laboratori degli altri Istituti Zooprofilattici o enti privati che aderiscono al *Circuito Aqua*. Come negli anni scorsi è stato inserito il circuito interlaboratorio per la diagnosi del virus della BVD-MD, ma soltanto ad uso esclusivo dei laboratori territoriali di questo Istituto, in quanto esiste sul territorio nazionale un centro di referenza.

In base alle adesioni ottenute, è stata stilata la seguente tabella che riporta il numero dei laboratori interni ed esterni partecipanti con l'indicazione per ciascuno gruppo delle prove di interesse:

TEST	Interni	Esterni
	RT-PCR BVDV	5
RT-PCR PRRSV (BM1/14)	2	4
PCR BHV-1 (BM2/14)	5	6
PCR Neospora (BM3/14)	4	5
<i>Coxiella b.</i> (BM4/14)	3	6
PCR PCV2 (BM5/14)	2	//

Si precisa che per il laboratorio di Legnaro, l'operatore che esegue il circuito è diverso da chi si occupa dell'allestimento dei campioni per quel circuito.

MATERIALI E METODI

Per ogni prova sono stati preparati ed inviati 10 campioni anonimi, identificati solo da un numero progressivo, dal nome del circuito e dalla matrice costituente il campione per facilitare le fasi di estrazione dell'acido nucleico oggetto della ricerca, favorendo la massima efficienza di questo passaggio, parte integrante del processo di diagnosi e garantendo per quanto possibile la capacità diagnostica del laboratorio esaminatore. I pannelli dei campioni selezionati da esaminare sono composti per la maggior parte da ceppi di collezione presenti presso il laboratorio di Virologia Diagnostica. In alcuni casi sono stati impiegati campioni di campo, precedentemente caratterizzati con altri metodi, come ad esempio il sequenziamento dell'amplificato (Neospora = cervello bovino positivo, PCV2) oppure isolamento in colture cellulari o saggio ELISA (BVD = siero di PI, organo), in altri casi abbiamo utilizzato ceppi virali di riferimento (BHV1, BHV-4 e PRRSV ceppo EU e AM) propagati in colture cellulari e controllati preventivamente per le prove oggetto del circuito. Infine, il pannello allestito per la ricerca del DNA di *Coxiella burnetii*, è costituito da aliquote tal quali e diluite di DNA di campioni positivi e da campioni di latte e organo positivi o negativi, inviati in tampone di lisi, per ragioni di sicurezza.

In linea di massima l'analisi preventiva assegna ad ogni campione preparato l'esito atteso. I campioni, attentamente selezionati nella ceppoteca, sono esaminati una prima volta per determinare il grado di positività degli stessi, quindi alcuni sono mantenuti tal quali, altri sono allestiti ad hoc tramite diluizione di campione positivo in campione negativo, per aumentare il range di osservazione della rilevabilità del metodo adottato e verificarne il mantenimento delle performance. Per i campioni costituiti da diluizioni seriali di campione positivo, l'esito atteso è talvolta considerato come "non definibile a priori" per diluizioni pari o superiori a quelli cosiddetti "soglia" ossia alla LoD (lower limit of detection), normalmente riscontrata in fase di validazione del metodo o di allestimento dei campioni. A tali diluizioni infatti l'esito può essere "positivo" o "negativo" per una maggiore o minore sensibilità analitica del metodo impiegato o in alcuni casi "dubbio" se la banda di amplificazione, seppure presente, non è ulteriormente caratterizzabile, come ad es. nel caso di restrizione enzimatica successiva all'amplificazione per la definitiva caratterizzazione dell'amplicone, laddove previsto.

Una volta preparati tutti i campioni selezionati e le relative diluizioni in volumi idonei per l'allestimento dei diversi pannelli, aliquote di ciascuno sono esaminate una seconda volta per controllare che il grado di positività corrisponda all'atteso. Se i risultati confermano quelli attesi, i campioni sono immediatamente etichettati e congelati a -80°C, ove restano conservati fino alla spedizione che avviene in ghiaccio secco nel mese di dicembre, accompagnati da una scheda di istruzioni. Nei laboratori destinatari i pannelli da esaminare erano da conservare in congelatore fino all'esecuzione dell'analisi. La data ultima per l'invio dei risultati era stabilita per il 31 gennaio 2015. Quest'anno una proroga nella restituzione degli esiti è stata accordata in quanto 2 laboratori non avevano ricevuto i pannelli nelle condizioni di conservazione idonee, pertanto sono stati inviati una seconda volta con una diversificazione nella data di consegna degli esiti.

Prima dell'invio dei pannelli, aliquote di ciascun campione sono analizzate dopo un primo congelamento per verificare l'eventuale perdita di segnale a causa dello scongelamento e contestualmente controllare la loro omogeneità. Infine, un operatore del laboratorio preparatore, non coinvolto nella preparazione dei pannelli esamina un'aliquota di ciascun campione allo scadere del termine di presentazione dei risultati,

come prova di stabilità nel tempo alle condizioni di conservazione previste per i pannelli.

Una volta ricevuti i dati dai laboratori partecipanti, si osservano i risultati grezzi ottenuti complessivamente e, se necessario, per alcuni campioni e per singola prova, vengono fatte delle considerazioni particolari, riportate nella sezione dei risultati nelle leggende dei grafici. In genere, nei casi di discordanza con l'atteso, si verifica il dato con quello ottenuto dal laboratorio preparatore, ma si tiene in conto anche dell'andamento preponderante dei laboratori partecipanti.

Le tabelle seguenti riportano i campioni distribuiti con la relativa descrizione ed il valore atteso:

RT-PCR PRRS	BM01/14	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Cellule MARC145 infette da ceppo americano diluito 1:100000	positivo ceppo AMERICANO (AME)
2	Siero negativo	negativo
3	Estratto d'organo positivo per PRSSV EU (cluster Italian-like) diluito 1:2 in organo negativo	positivo ceppo europeo (EU)
4	Cellule MARC145 infette da ceppo americano ed europeo (AME+EU) diluito 1:10000	negativo positivo ceppo AME+ EU
5	Siero positivo per PRRSV EU diluito 1:200 in MEM	positivo ceppo EU
6	Cellule MARC145 infette da ceppo americano diluito 1:1000000	positivo ceppo AME
7	Estratto d'organo positivo per PRSSV EU diluito 1:100	positivo ceppo EU
8	Estratto d'organo negativo per PRSSV	negativo
9	Cellule MARC 145 infette da ceppo europeo diluite 1:1000 in cellule MARC non infette	positivo ceppo EU
10	Estratto d'organo positivo per PRSSV EU non diluito	positivo ceppo EU

PCR BHV-1	BM02/14	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Cellule di rene bovino infette da BHV-1 diluite 1:1000 in cellule negative	positivo BHV-1
2	Estratto di organo positivo per BHV-1 diluito 1:10 in estratto d'organo negativo	positivo BHV-1
3	Cellule di rene bovino infette da BHV-4 non diluite	negativo BHV-1 e positivo BHV-4
4	Estratto di organo positivo per BHV-1 non diluito	positivo BHV-1
5	Cellule di rene bovino infette da BHV-1 diluite 1:50 in cellule negative	positivo BHV-1
6	Estratto di organo negativo per BHV-1, positivo per <i>Pasteurella</i>	negativo
7	Estratto di organo positivo per BHV-1 non diluito	positivo BHV-1
8	Cellule di rene bovino non infette	negativo
9	Estratto di organo positivo per BHV-1 diluito	positivo BHV-1

	1:50 in organo negativo	
10	Estratto di organo positivo per BHV-1 non diluito	positivo BHV-1

PCR Neospora c.		BM03/14
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo Neo
2	Estratto di cervello positivo per Neospora diluito 1:10 in cervello negativo	positivo Neo
3	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo Neo
4	Estratto di cervello negativo per Neospora	negativo Neo
5	Estratto di organo negativo per Neospora e positivo per Toxoplasma diluito 1:10	negativo Neo (positivo Toxoplasma)
6	Estratto di cervello positivo per Neospora	positivo Neo
7	Estratto di organo positivo per Neospora diluito 1:10	positivo Neo
8	Estratto di cervello positivo per Neospora	positivo Neo
9	Estratto di organo negativo per Neospora e positivo per Atoxoplasma	negativo Neo (positivo Atoxoplasma)
10	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo Neo

PCR Coxiella b.		BM04/14
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto d'organo positivo per <i>Coxiella b.</i> in tampone di lisi	positivo
2	Latte positivo in tampone di lisi diluito 1:500	positivo
3	DNA di un campione negativo	negativo
4	DNA di un controllo positivo diluito 1:1000	positivo
5	Latte positivo in tampone di lisi diluito 1:10	positivo
6	Latte negativo in tampone di lisi	negativo
7	Latte positivo in tampone di lisi diluito 1:50	positivo
8	Estratto d'organo positivo per <i>Coxiella b.</i> in tampone di lisi	positivo
9	DNA di un controllo positivo diluito 1:100	positivo
10	Latte positivo in tampone di lisi non diluito	positivo

PCR circo virus tipo 2		BM05/14
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto d'organo positivo diluito 1:10	positivo
2	Estratto d'organo positivo diluito 1:100	positivo
3	Siero negativo per PCV2	negativo
4	Siero positivo per PCV2	positivo
5	Estratto d'organo positivo per PCV2 1:10	positivo
6	Estratto d'organo negativo	negativo
7	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	positivo
8	Cellule di rene suino PK15 non infette da PCV2	negativo
9	Estratto d'organo positivo per PCV2 1:50	positivo
10	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	positivo

Elaborazioni statistiche

L'analisi dei campioni del circuito fornisce una risposta di tipo qualitativo: positivo o negativo e in alcuni casi la denominazione del positivo. E' importante conoscere la validità di un test, cioè la proporzione di campioni identificati correttamente e il Kappa di Cohen è una misura dell'accordo (coefficient of agreement) tra le risposte qualitative o categoriali di un laboratorio e del laboratorio di riferimento detto "gold standard" e dei laboratori partecipanti.

L'indice K di concordanza può assumere valori compresi tra -1 (massimo disaccordo) e +1 (massimo accordo). Se l'accordo osservato è uguale all'accordo atteso per effetto del caso, K assume un valore uguale a 0 (accordo nullo). Ad ogni valore di K è associata la significatività (p-value) che indica se l'accordo osservato è reale o semplicemente dovuto al caso.

A scopo interpretativo, si suggerisce l'utilizzo della scala di Landis & Koch così strutturata:

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

Riservatezza

Per garantire la riservatezza dei dati, i laboratori sono identificati mediante un codice, che viene comunicato via mail in forma confidenziale a ciascun partecipante per la decodifica del proprio risultato e può variare di anno in anno in funzione del numero dei partecipanti ai vari circuiti. I dati raccolti durante il circuito interlaboratorio, trattati in forma confidenziale e riservata, sono impiegati dal laboratorio organizzatore soltanto per l'analisi e la valutazione dei risultati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale nel 2014, 16 laboratori hanno aderito al circuito Aqua per analisi di biologia molecolare nell'ambito delle specie bovine e suine. Tutti i laboratori ad eccezione di uno hanno fatto pervenire i dati ottenuti che sono stati analizzati come precedentemente descritto.

I risultati sono riportati nelle pagine seguenti, ogni analisi è considerata singolarmente. Per ogni prova compaiono tre tabelle e due grafici: nella prima tabella sono indicati i dati grezzi ottenuti da ciascuno dei laboratori partecipanti. In questa tabella, come da legenda, sono evidenziati in rosso gli esiti discordanti realmente dall'atteso; in verde quelli concordanti e in giallo quei risultati per i quali venga effettuata una valutazione a sé stante (cfr. Materiali e Metodi). Nella seconda tabella sono riportati tutti i laboratori partecipanti con l'indicazione per ciascuno del valore K appaiato al valore della significatività (p-value) ed infine, nell'ultima colonna a destra, sono mostrati i valori "K e p" complessivi di tutto il circuito. Il grafico esemplificativo mostra l'andamento osservato. Nella terza tabella e nel grafico successivo sono presenti i valori di "K e p" ottenuti dai laboratori delle sezioni territoriali dell'IZS-Ve ed il valore complessivo dell'Istituto stesso con l'andamento rappresentato graficamente.

PRRS: ring test per laboratori Circuito Aqua ed IZS-Ve

Tabella 1: dati grezzi

codice lab. /campioni	2	5	8	9	11	14	valore atteso
1	pos AME	pos AME	pos AME	pos	pos AME	pos AME	pos AME
2	neg	neg	neg	neg	neg	pos EU	neg
3	pos AME	pos EU	pos EU	pos	pos EU	pos EU	pos EU
4	pos EU + AME	pos EU + AME	pos EU + AME	pos	pos EU + AME	pos AME	pos EU + AME
5	pos EU	pos EU	pos EU	pos	pos EU	pos EU	pos EU
6	pos AME	pos AME	pos AME	pos	pos AME	neg	pos AME
7	pos EU	pos EU	pos EU	pos	pos EU	neg	pos EU
8	pos EU	neg	neg	neg	neg	pos EU	neg
9	pos EU	pos EU	pos EU	pos	pos EU	pos EU	pos EU
10	pos EU	pos EU	pos EU	pos	pos EU	pos EU	pos EU

Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

Esito discordante dall'atteso da considerare non accettabile.

Esito concorde solo in parte, pur se discordante dall'atteso, da considerare nel calcolo statistico come accettabile.

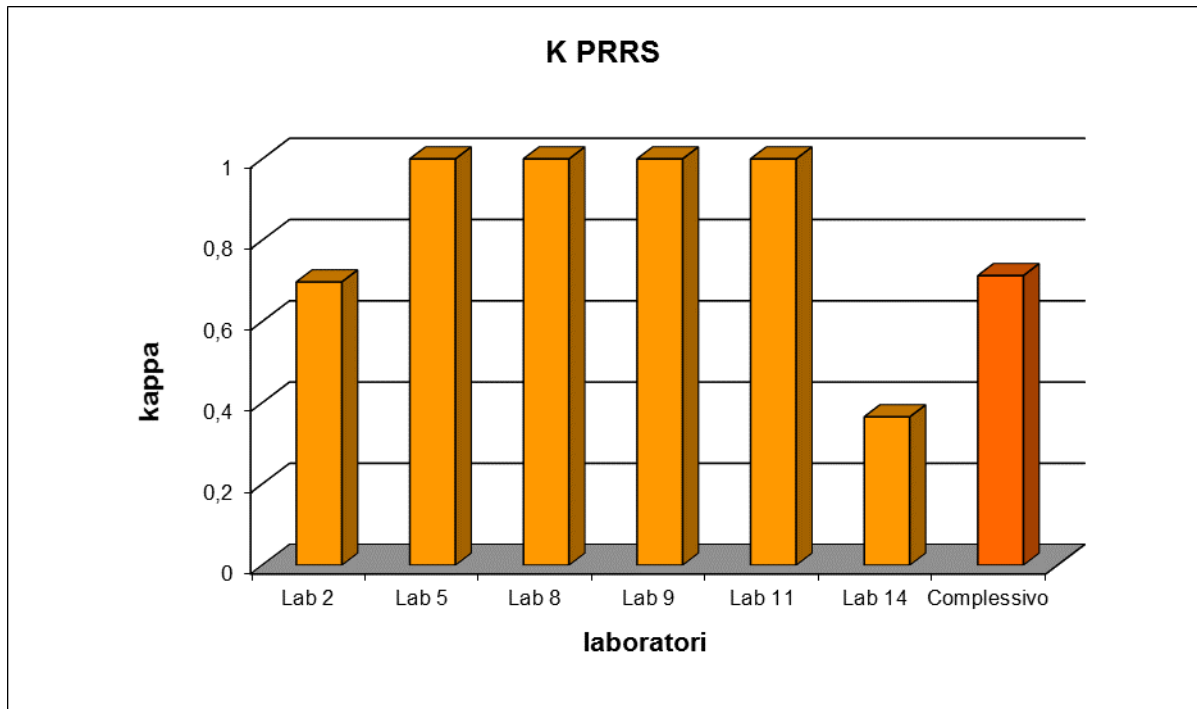


Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	Lab 2	Lab 5	Lab 8	Lab 9	Lab 11	Lab 14	complessivo
K	0,6970	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3651	0,7126
p-value	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0314	0,0000

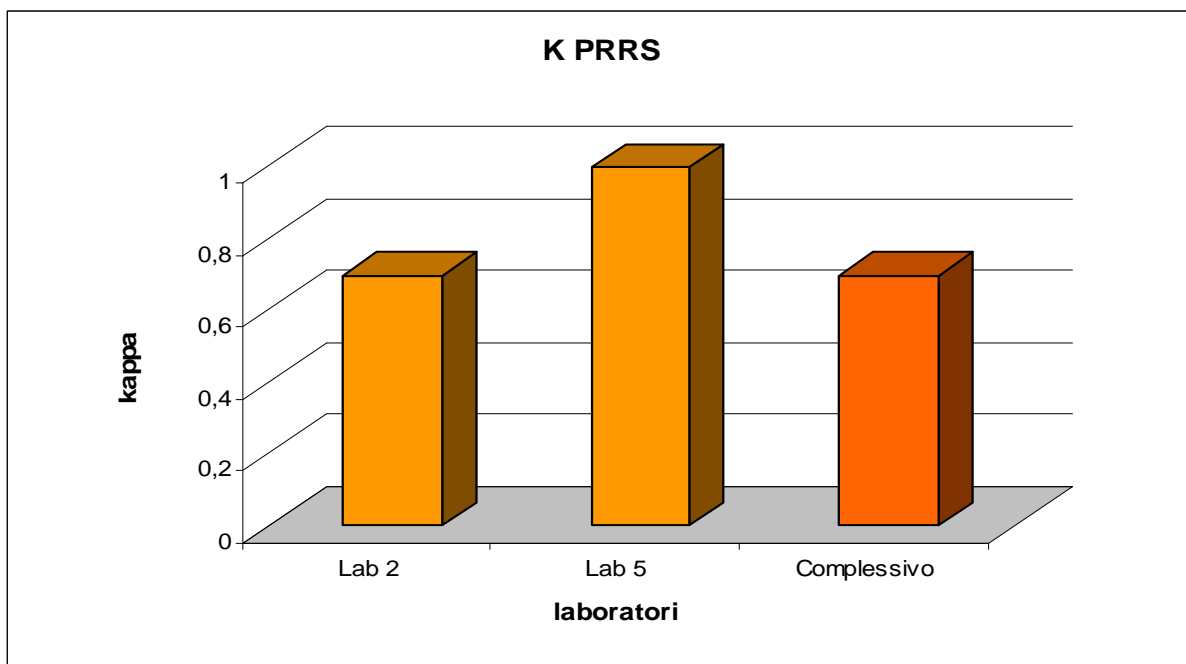


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZSVe

	Lab 2	Lab 5	Complessivo
K	0,697	1	0,697
p-value	0,0002	0	0,0002

Tutti i laboratori hanno un K significativo. Il laboratorio 14 ha un valore di K discreto, il laboratorio 2 buono, mentre tutti gli altri laboratori presentano un K ottimo. L'accordo complessivo e l'accordo dell'IZSVe è buono.

Il pannello per la diagnosi di PRRSV nel suo complesso è stato correttamente identificato in quasi tutti i laboratori, tranne nel laboratorio 2 e 14. Il laboratorio n.2 ha verosimilmente avuto un problema di identificazione di 2 campioni, visto che il numero dei positivi e negativi totale è corretto, ma l'identificazione è apparentemente invertita in 2 campioni positivi. Il laboratorio n.14, invece, ha ottenuto un valore di K discreto, in quanto in 2 casi ha fornito esiti falsamente positivi e in 2 casi falsamente negativi.

Approfondendo l'analisi per singola prova, nel caso del circuito BM1/14 (PRRSV), come l'anno precedente per la diagnosi del virus della PRRS, è stata posta una particolare attenzione alla capacità di rilevazione di ceppi di PRRS di tipo europeo, cosiddetti Italian-like, ovvero quelli che hanno mostrato una maggiore variabilità genomica pur appartenendo al suddetto cluster di ceppi virali. Tutti i laboratori eccetto uno, hanno dimostrato la capacità di riconoscere correttamente questo campione tra quelli del pannello.

BHV-1: ring test per laboratori Circuito Aqua ed IZS-Ve

Tabella 1: dati grezzi

codice lab. /campioni	1	2	4	5	6	11	12	14	16	valore atteso
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	neg (BHV-4)	neg (BHV-4)	neg (BHV-4)	neg (BHV-4)	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

Esito discordante dall'atteso da considerare non accettabile.

Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	Lab 1	Lab 2	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 11	Lab 12	Lab 14	Lab 16	Complessivo
K	1,0000	1,00001	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000

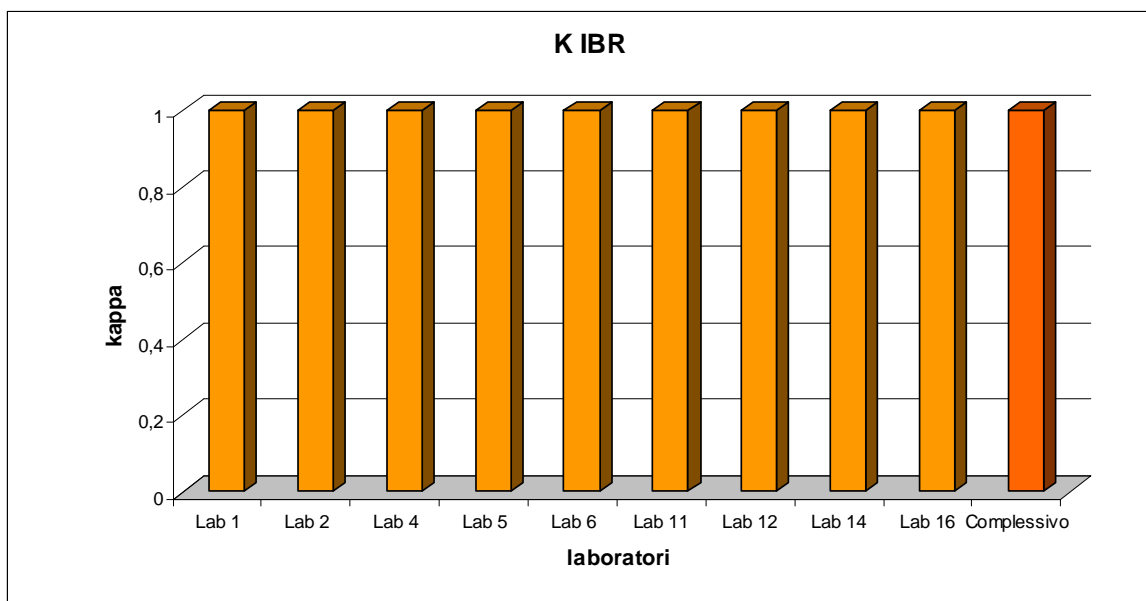
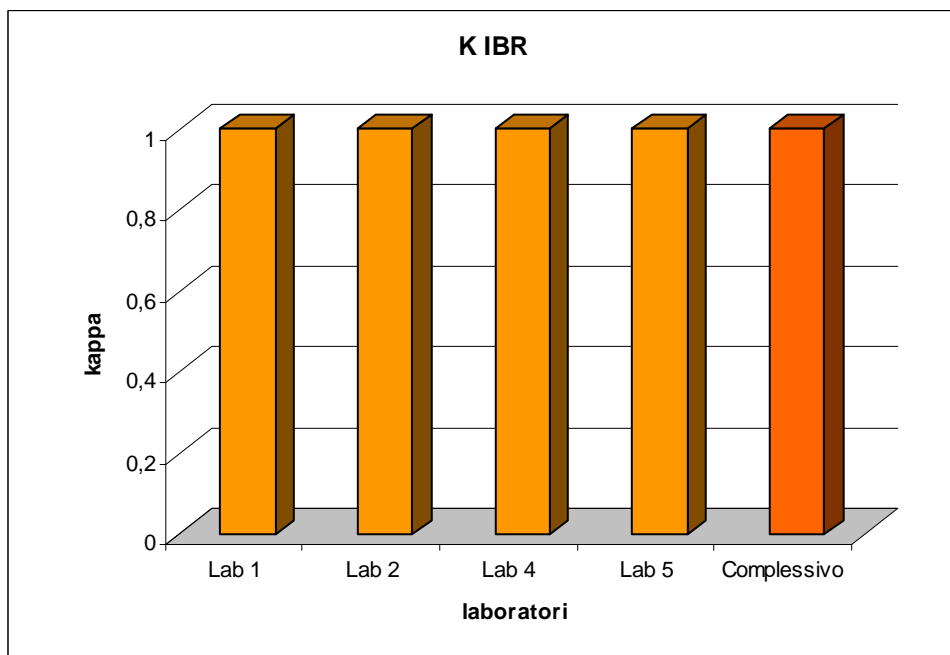


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZSVe

	Lab 1	Lab 2	Lab 4	Lab 5	Complessivo
K	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000



Tutti i laboratori hanno un K significativo e ottimo. L'accordo complessivo tra i laboratori è ottimo così pure quello tra i laboratori IZSVe. La prova valutativa per la diagnosi di IBR ha mostrato un risultato omogeneo tra tutti i partecipanti, indipendentemente dall'uso di un protocollo di PCR end-point (6/9) o PCR real time (3/9).

Neospora caninum: ring test per laboratori Circuito Aqua ed IZS-Ve

Tabella 1: dati grezzi

codice lab. / campioni	1	2	3	5	8	10	12	13	14	valore atteso
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos
8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

Esito discordante dall'atteso da considerare non accettabile.

Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 5	Lab 8	Lab 10	Lab 12	Lab 13	Lab 14	Complessivo
K	1,0000	0,7826	1,0000	1,0000	0,7826	0,6000	0,6000	1,0000	1,0000	0,7967
p-value	0,0008	0,0056	0,0008	0,0008	0,0056	0,0192	0,0192	0,0008	0,0008	0,0000

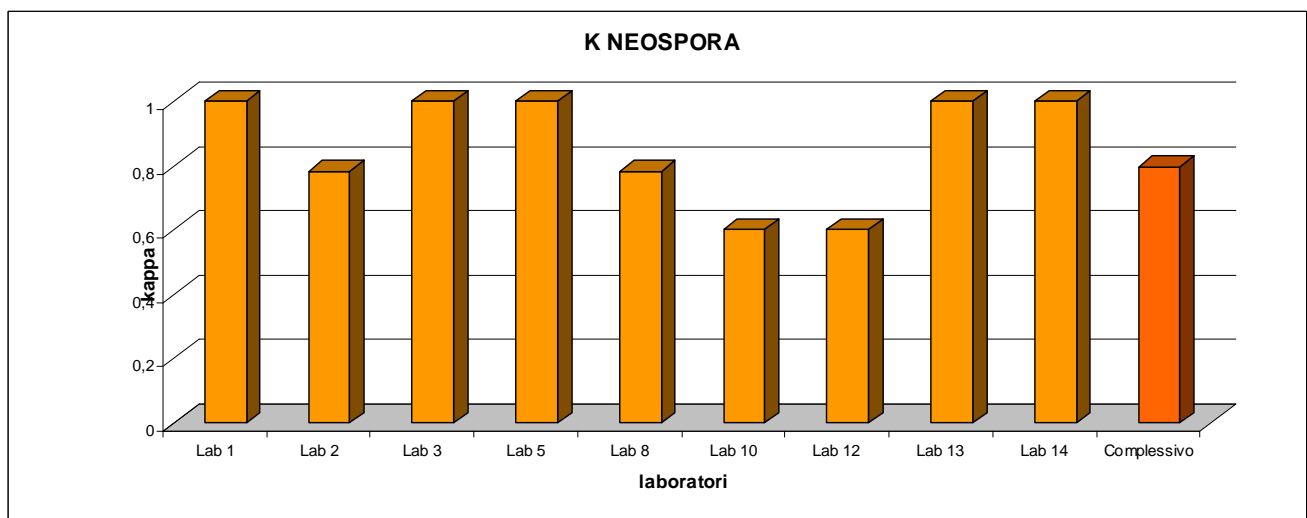
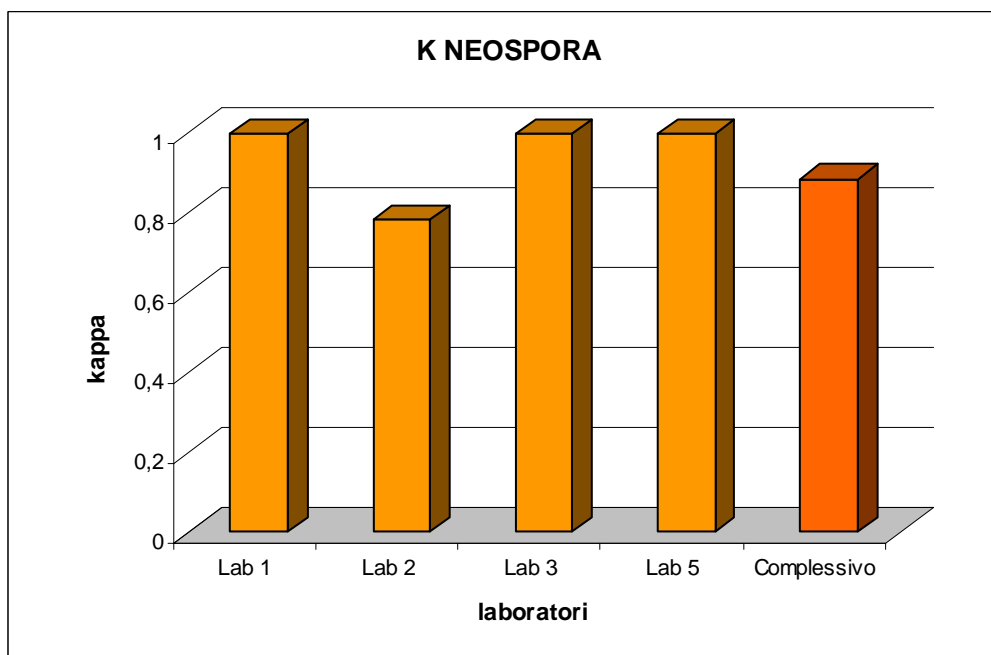


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZS-Ve

	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 5	Complessivo
K	1,0000	0,7826	1,0000	1,0000	0,886

p-value	0,0008	0,0056	0,0008	0,0008	0,0000
----------------	--------	--------	--------	--------	--------



Tutti i laboratori presentano un K significativo. I laboratori 1, 3, 13 e 14 hanno un K ottimo, i laboratori 2 e 8 buono e i laboratori 10 e 12 moderato. L'accordo complessivo tra i laboratori è buono mentre è ottimo quello tra i laboratori IZSVE.

In questa prova 4/9 laboratori partecipanti hanno identificato in modo falsamente negativo un omogenato di cervello bovino infetto da *Neospora c.* che non era stato diluito e 2/9 partecipanti non hanno riconosciuto anche un altro campione positivo compreso nel pannello che era stato diluito 1:10 in omogenato negativo, mostrando un deficit di sensibilità, in maniera indipendente dalla metodica usata poiché tutti i laboratori tranne 1 utilizzano un protocollo di PCR end-point per questa diagnosi.

Coxiella burnetii : ring test per laboratori Circuito Aqua ed IZS-Ve

Tabella 1: dati grezzi

codice lab. /campioni	1	3	5	7 end-point	7 real-time	8	10	12	13	valore atteso
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
4	pos	pos	pos	neg	inib	neg	neg	neg	neg	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
7	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos
8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9	pos	pos	pos	neg	inib	neg	neg	pos	neg	pos
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

Esito discordante dall'atteso da considerare non accettabile.

Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	Lab 1	Lab 3	Lab 5	Lab 7_ep	Lab 7	Lab 8	Lab 10	Lab 12	Lab 13	Compless
K	1,0000	1,0000	1,0000	0,5455	0,5455	0,1935	0,2857	-0,3158	0,1935	0,3442
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0264	0,0264	0,1503	0,0984	0,8497	0,1503	0,000

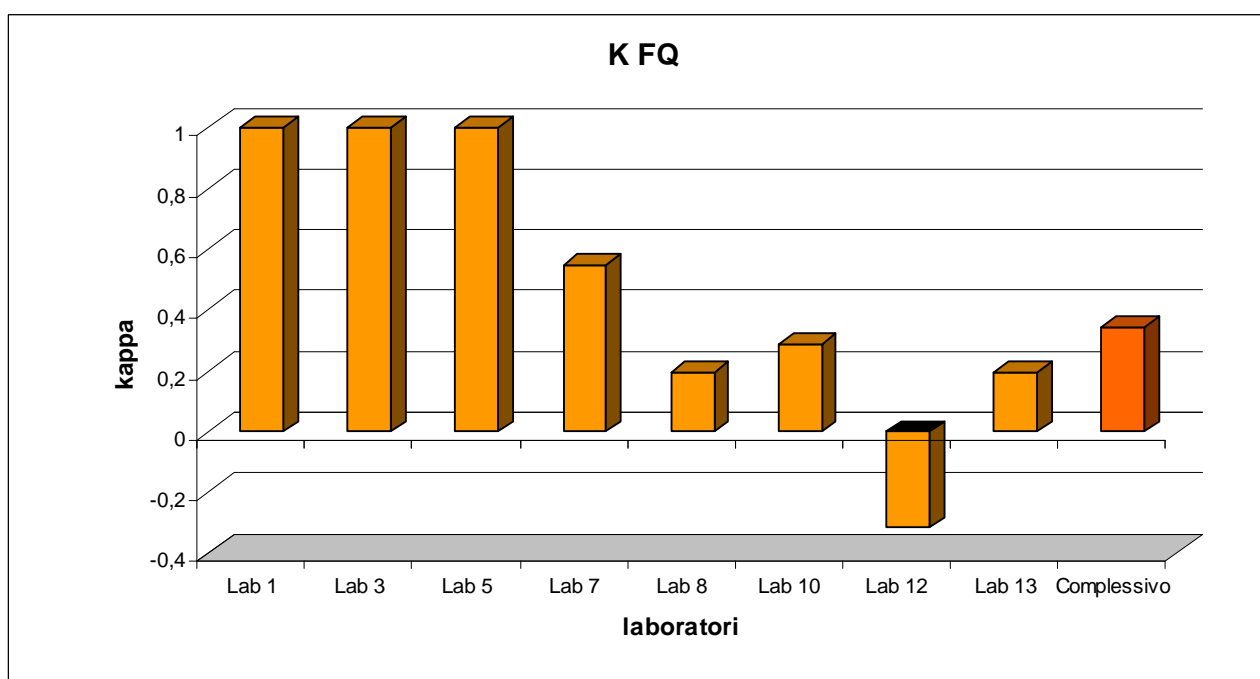


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZSVe

	Lab 1	Lab 3	Lab 5	Complessivo
Kappa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000



I laboratori 8, 12 e 13 presentano un K non significativo per cui l'accordo o disaccordo osservato è dovuto al caso. I laboratori 1, 2 e 3 presentano un K ottimo, il laboratori 7 e 7b un K moderato, mentre il laboratorio 10 un K discreto, ma al limite della significatività.

L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori (escluso lab 7_ep) è discreto. L'accordo dei laboratori IZSVe è ottimo.

La prova valutativa per la ricerca del DNA di *Coxiella* è stata quella che ha mostrato una maggiore eterogeneità di risultati tra i laboratori partecipanti. In particolare, in 4/8 e in 5/8 laboratori rispettivamente, i campioni di DNA diluiti 1:100 e 1:1000, risultano non identificati. Analogamente 3/8 laboratori hanno registrato un deficit di sensibilità non riconoscendo come positivi per *Coxiella* i campioni di latte, se diluiti 1:500, 1:10 e 1:50. Se questo sia imputabile alla matrice o meno potrà essere stabilito con delle prove *ad hoc* da ciascun laboratorio partecipante, tuttavia il deficit registrato, anche in caso di campioni di DNA già estratto e diluito, farebbe escludere questa ipotesi. Certamente tali risultati sono indipendenti dal protocollo di PCR endpoint o Real time impiegato nella determinazione, in quanto tutti i laboratori che hanno registrato dei risultati non corretti hanno usato entrambi i protocolli.

Circovirus suino tipo 2: ring test per laboratori Circuito Aqua ed IZS-Ve

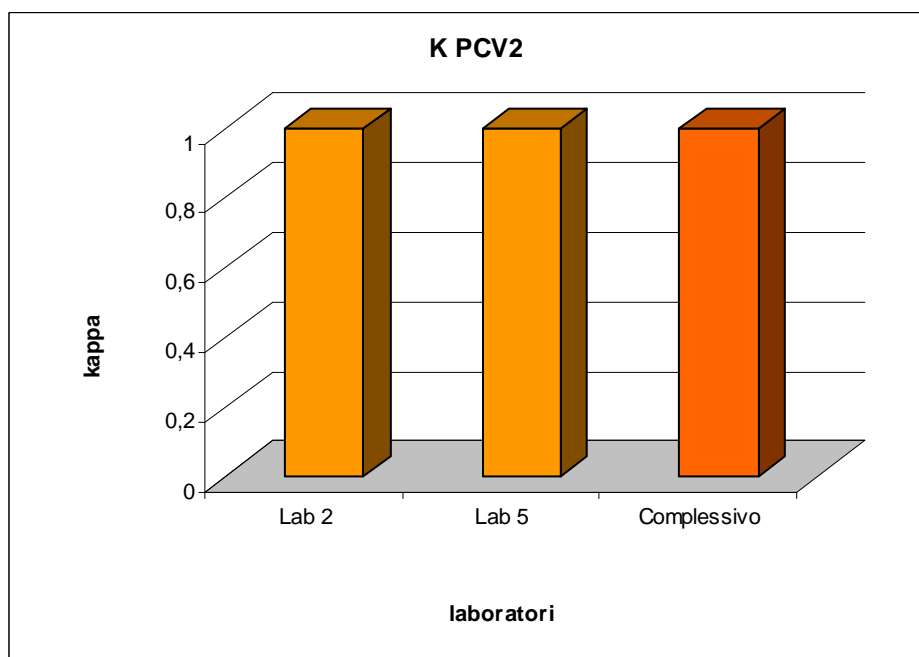
Tabella 1: dati grezzi

codice lab. /campioni	2	5	valore atteso
1	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos
3	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg
7	pos	pos	pos
8	neg	neg	neg
9	pos	pos	pos
10	pos	pos	pos

Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	Lab 2	Lab 5	Complessivo
Kappa	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	0,0008	0,0008	0,0008



Entrambi i laboratori hanno un K significativo e ottimo. Anche l'accordo complessivo è ottimo.

CONCLUSIONI

Come si può evincere dai grafici relativi, l'andamento di ciascun circuito in base ai valori ottenuti mostra che molti dei protocolli impiegati, specialmente all'interno del nostro Istituto, sono da considerarsi validi. Nel caso dei laboratori dell'IZS-Ve, infatti l'accordo ottenuto è sempre ottimo, tranne in un caso, a dimostrazione della robustezza dei metodi impiegati per questo genere di analisi. Il trend è comunque positivo per tutti i circuiti, fatta eccezione per pochi laboratori del Circuito Aqua, dove si sono riscontrati dei problemi nell'individuazione di alcuni patogeni, in particolare in caso di campioni positivi e diluiti, come si è discusso nelle singole prove (BM03/14 e BM04/14).

Esaminando l'andamento dei circuiti con riferimento ai metodi impiegati nei diversi laboratori (PCR end-point o Real time PCR), nel presente circuito non è stata osservata una differenza nella sensibilità analitica legata al metodo impiegato, se di tipo tradizionale end-point o Real time, come invece era stato evidenziato nel precedente circuito.