



Circuito interlaboratorio  
per l'assicurazione qualità  
dei risultati



Circuito diagnostica bovina e suina mediante tecniche biomolecolari  
**Report definitivo schemi BM01-18, BM02-18, BM03-18, BM04-18,  
BM05-18**

Maggio 2020



**Laboratorio di virologia diagnostica**  
SCT3 – Padova e Adria – Diagnostica in sanità animale  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



## Circuiti interlaboratorio Aqua BM



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

**Aqua BM01-18, BM02-18, BM03-18, BM04-18, BM05-18**

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

**Responsabile del Circuito interlaboratorio Aqua BM:  
Dr. Stefano Nardelli  
[snardelli@izsvenezie.it](mailto:snardelli@izsvenezie.it)  
049/8084358**

**Esperto tecnico:  
Dr.ssa Letizia Ceglie  
[lceglie@izsvenezie.it](mailto:lceglie@izsvenezie.it)  
049/8084237**

**Esperto statistico:  
Dr.ssa Marzia Mancin  
[mmancin@izsvenezie.it](mailto:mmancin@izsvenezie.it)  
049/8084431**

**Schema BM01, BM02, BM03, BM04, BM05**

## REPORT DEFINITIVO

### Introduzione: pianificazione dei circuiti interlaboratorio di diagnostica bovina e suina mediante tecniche biomolecolari

Questo report definitivo 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 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 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 tutti i laboratori facenti richiesta, come laboratori afferenti ad altri Istituti Zooprofilattici o ad enti privati.

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

<b>Circuito interlaboratorio</b>	<b>Totale adesione laboratori</b>
RT-PCR PRRSV (BM1/18)	7
PCR BHV-1 (BM2/18)	9
PCR Neospora (BM3/18)	10
<i>Coxiella b.</i> (BM4/18)	9
PCR PCV2 (BM5/18)	5

Infine 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.

### 1 – CARATTERISTICHE, COMPOSIZIONE E CONTROLLO DEI CAMPIONI

Per ogni prova sono stati preparati ed inviati 10 campioni anonimi, identificati univocamente; in ogni singola etichetta nell'ordine sono riportati il laboratorio cui è

destinato il campione (ad es. lab.2), il circuito di appartenenza del campione attraverso il patogeno ricercato (ad es: PCV2 al posto di BM05/18), la tipologia della matrice di quel campione (ad es. siero/ cellule/ organo/ latte /DNA) e un numero che lo identifica (es: 99) che è univoco per laboratorio/circuito e matrice. I pannelli dei campioni selezionati da esaminare con metodi biomolecolari a scelta (ad es. PCR end-point o Real-time) 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 (circa 20 µL), di campioni positivi e da campioni di latte e organo positivi o negativi (circa 750µL), inviati in tampone di lisi, per ragioni di sicurezza.

In genere le provette destinate a tutte le analisi contengono materiale per due estrazioni (circa 450-500µl), ad eccezione del pannello BM4.

I campioni, 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 verificare contemporaneamente 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.

### **Prove di omogeneità e stabilità**

Una volta preparati tutti i campioni selezionati e le relative diluizioni in volumi idonei per l'allestimento dei diversi pannelli, aliquote di ciascun campione sono esaminate una seconda volta per controllare che il grado di positività riscontrato dopo la preparazione 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 è avvenuta in ghiaccio secco nel mese di dicembre 2018, accompagnati da una scheda descrittiva. Inoltre, dopo un primo congelamento e prima dell'invio dei pannelli, 3 aliquote di ciascun campione sono analizzate nel laboratorio preparatore.

Nell'arco di tempo di 1 settimana successiva alla prima verifica, infatti, sono scongelate 3 aliquote di ciascun campione, che vengono conservate a temperatura di refrigerazione ed analizzate in giornate diverse e successive per verificare l'eventuale perdita di segnale a causa dello scongelamento e contestualmente controllare la loro omogeneità. Infine, un operatore appartenente al laboratorio preparatore, ma 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.

Se queste prove danno risultati conformi all'atteso, si dimostra che né le operazioni di allestimento dei pannelli, né eventuali disfunzioni nella conservazione, eventualmente subite nel trasporto hanno verosimilmente inficiato l'attendibilità del dato del campione in esame. Viceversa, se durante le prove uno o più campioni non si dimostra stabile o omogeneo, viene sostituito nel pannello e le prove sono ripetute solo sui campioni problematici.

## 2 – MODALITÀ DI TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni non sono inviati sotto forma di liofilati, pertanto non vengono prescritte delle modalità di risospensione. All'atto dell'invio dei pannelli a ciascun laboratorio partecipante è indirizzata una lettera in allegato che descrive i campioni costituenti i diversi schemi in termini di volumi e matrice. L'indicazione della tipologia dalla matrice costituente ciascun campione del pannello è presente sull'etichetta 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.

Nei laboratori destinatari i pannelli da esaminare sono da conservare in congelatore fino all'esecuzione dell'analisi. La data ultima per l'invio dei risultati era stabilita per il **31 gennaio 2019**.

## 3 – DETERMINAZIONE DEI VALORI ATTESI

In linea di massima l'analisi preventiva assegna ad ogni campione preparato l'esito atteso. 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:**

Lo schema "PRRS" (BM01/18) contiene 10 provette costituite da campioni di omogenati d'organo, sieri e lisati cellulari infetti.

RT-PCR PRRS	BM01/18	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Siero positivo per ceppo di PRSSV EU diluito 1:20	<b>positivo EU</b>
2	Cellule infette con ceppo di PRRSV AME diluite 1:100	<b>positivo AME</b>
3	Cellule non infette	<b>negativo</b>
4	Siero positivo per ceppo di PRSSV EU diluito 1:10	<b>positivo EU</b>
5	Organo positivo PRRSV EU diluito 1:10 (cluster Italian-like)	<b>positivo EU Italian-like</b>
6	Organo positivo PRRSV EU diluito 1:10	<b>positivo EU</b>
7	Cellule infette con ceppo di PRRSV EU diluite 1:10	<b>positivo EU</b>
8	Organo positivo ceppo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
9	Organo negativo	<b>Negativo</b>
10	Siero positivo per ceppo PRRSV EU diluito 1:10	<b>positivo EU</b>

Lo schema "IBR" (BM02/18) contiene 10 provette di campioni costituiti da omogenati d'organo e lisati cellulari infetti oppure non infetti.

PCR BHV-1	BM02/18	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto di organo positivo per BHV-1 non diluito a debole reattività	positivo
2	Estratto di organo positivo per BHV-1 non diluito	positivo
3	Estratto di organo positivo per BHV-1 non diluito	positivo
4	Estratto di organo negativo per BHV-1	negativo
5	Cellule di rene bovino infette da BHV-1, diluite 1:1000 in cellule negative debole reattività	positivo
6	Cellule di rene bovino infette da BHV-1, diluite 1:100 in cellule negative	positivo
7	Cellule di rene bovino infette non infette	negativo
8	Estratto di organo positivo per BHV-1	positivo
9	Estratto di organo positivo per BHV-1	positivo
10	Cellule di rene bovino infette da BHV-4	negativo IBR positivo BHV-4

Lo schema "Neospora" (BM03/18) contiene 10 provette: tutti i campioni sono costituiti da omogenati d'organo.

PCR <i>Neospora caninum</i>	BM03/18	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo
2	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo
3	Estratto di cervello negativo per Neospora	negativo
4	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo
5	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo
6	Estratto di organo negativo per Neospora e positivo per Toxoplasma°	Negativo NEO Positivo TOXO
7	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo
8	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo
9	Estratto di cervello negativo per Neospora	negativo
10	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	positivo

Organo °: positivo Toxoplasma.

Lo schema "FQ" (BM04/18) contiene 10 provette, 4 delle quali sono costituite da DNA (20µl) già estratto. Diversamente, erano da estrarre, secondo le normali procedure di laboratorio, gli altri 6 campioni che sono costituiti da un campione di latte e 5 omogenati d'organo, inviati per ragioni di sicurezza in tampone di lisi ATL (Qiagen) (750µl). Laddove i campioni allestiti fossero stati diluiti è riportato in tabella.



PCR <i>Coxiella burnetii</i>	BM04/18	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Latte positivo in tampone di lisi non diluito	Positivo
2	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> in tampone di lisi, diluito 1:10000	Positivo
3	Estratto d'organo negativo per <i>C. burnetii</i> in tampone di lisi	Negativo
4	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> in tampone di lisi, diluito 1:100000	Positivo
5	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> in tampone di lisi, diluito 1:1000	Positivo
6	Estratto d'organo negativo per <i>C. burnetii</i> in tampone di lisi	Negativo
7	DNA positivo per <i>C. burnetii</i> , non diluito	Positivo
8	DNA positivo per <i>C. burnetii</i> , non diluito	Positivo
9	DNA di un campione negativo	Negativo
10	DNA positivo per <i>C. burnetii</i> , non diluito	Positivo

Lo schema "PCV2" (BM05/18) contiene 10 provette contenenti campioni costituiti da 3 siero e da 7 omogenati d'organo.

PCR <i>circovirus tipo 2</i>	BM05/18	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	positivo
2	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	positivo
3	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	positivo
4	Estratto d'organo negativo per PCV2 non diluito	negativo
5	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	positivo
6	Siero positivo per PCV2 diluito 1:10	positivo
7	Siero negativo per PCV2 non diluito	negativo
8	Estratto d'organo negativo per PCV2 diluito 1:10	positivo
9	Estratto d'organo positivo per PCV2	positivo borderline/ negativo
10	Siero positivo per PCV2 diluito 1:5	positivo

#### 4 – DETERMINAZIONE DEI VALORI ASSEGNATI

##### 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 schemi. 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.

Di seguito sono presenti le tabelle per la decodifica dei campioni per ciascun pannello e per laboratorio.

**TABELLE DI DECODIFICA DEI CAMPIONI PER SCHEMA**

campione	PRRS BM01-18						
	lab2	lab3	lab8	lab9	lab11	lab14	lab 16
1	42	623	202	215	690	708	407
2	475	727	280	465	537	457	584
3	139	213	232	301	265	379	384
4	373	88	364	474	562	190	82
5	600	377	388	228	185	435	242
6	492	163	460	295	514	776	193
7	670	414	430	229	380	778	337
8	204	722	783	564	391	481	625
9	443	660	29	186	142	495	60
10	580	574	154	221	408	697	297

campione	IBR BM02-18								
	lab 1	lab 2	lab 4	lab 6	lab 11	lab 12	lab 14	lab 15	lab 18
1	799	257	327	266	137	374	365	420	170
2	83	569	77	39	506	567	97	369	172
3	779	255	686	634	603	517	134	333	710
4	744	486	691	162	227	129	591	23	524
5	239	504	156	40	292	354	658	267	485
6	263	689	612	207	501	525	575	224	784
7	785	413	592	527	648	166	633	444	644
8	258	198	622	499	92	782	235	102	346
9	209	330	307	104	411	669	48	576	216
10	606	319	761	497	764	210	487	287	385

campione	NEO BM03-18									
	lab1	lab2	Lab4	lab5	lab8	lab10	lab12	lab13	lab14	lab17
1	389	349	684	753	135	254	191	613	286	179
2	706	568	756	735	331	173	386	432	640	262
3	510	371	218	780	272	528	461	270	282	351
4	629	755	534	238	742	675	95	115	772	398
5	480	702	159	773	570	476	734	655	604	182
6	719	342	659	423	666	452	747	752	392	539
7	586	595	624	177	422	450	306	794	51	707
8	795	323	685	589	439	745	68	798	418	645
9	305	687	410	35	566	189	456	314	63	274
10	548	610	34	250	725	281	775	276	188	240



campione	FQ BM04-18								
	lab1	lab2	Lab4	lab7	lab10	lab12	lab13	lab17	lab19
1	155	516	353	711	376	767	110	347	703
2	22	192	412	683	445	269	678	665	550
3	147	532	520	387	74	605	557	540	25
4	508	370	141	478	672	545	523	89	31
5	199	124	393	341	743	43	598	680	611
6	121	145	164	638	277	651	505	375	466
7	754	93	247	599	607	676	519	58	136
8	593	770	237	268	214	383	315	249	343
9	278	630	241	362	72	112	716	578	201
10	390	493	631	563	788	455	174	404	308

campione	PCV2 BM05-18				
	lab2	lab3	lab11	lab14	lab16
1	627	325	426	673	468
2	55	65	704	705	437
3	446	125	130	211	78
4	738	479	751	143	551
5	471	419	470	597	180
6	766	741	113	47	536
7	345	663	617	243	791
8	290	668	399	796	736
9	279	489	434	119	441
10	467	473	340	459	222

## 5 – PRESENTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### 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

## 5.1 - RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale, nel 2018, 19 laboratori hanno aderito al circuito interlaboratorio Aqua per le analisi di biologia molecolare (BM) 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.

In genere, una volta ricevuti i dati dai laboratori partecipanti, i risultati grezzi ottenuti complessivamente si controllano e, se necessario, per alcuni campioni e per singola prova, sono fatte delle considerazioni particolari, riportate nella sezione dei risultati nelle leggende dei grafici.

I risultati sono riportati nelle pagine seguenti, ogni schema è considerato 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 le celle con gli esiti discordanti realmente dall'atteso; in bianco le celle con gli esiti concordanti e in giallo quelle con risultati per i quali venga effettuata una valutazione a sé stante. Nella seconda tabella sono riportati tutti i laboratori partecipanti con l'indicazione del valore K appaiato al valore della significatività (p-value) per ciascuno di loro 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	3	8	9	11	14	16
1	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
2	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME
3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
4	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
5	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU

6	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	negativo	pos EU	pos EU
7	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
8	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
9	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
10	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU

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 e complessivo

	lab2	lab3	lab8	lab9	lab11	lab14	lab16	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	0,7368	1	1	0,9152
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0079	0,0008	0,0008	0,0000

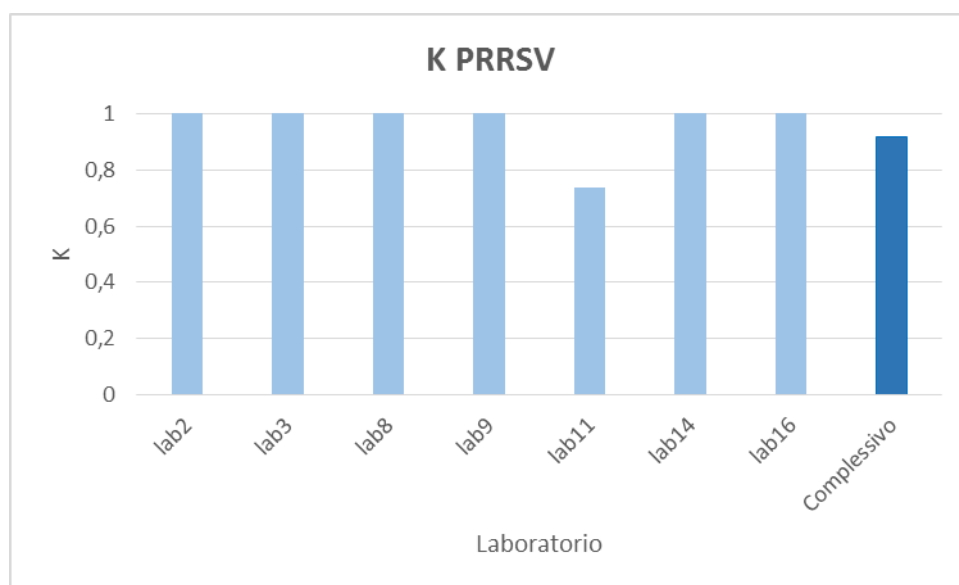
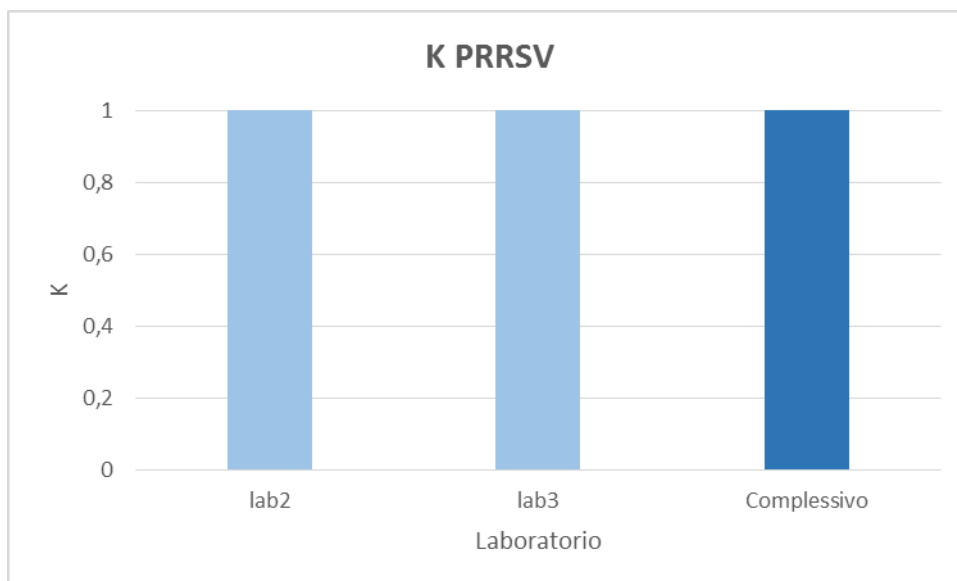


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZSVe

	lab2	lab3	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008



Tutti i laboratori presentano un K significativo e ottimo ad eccezione del laboratorio 11 che presenta un accordo buono con l'esito atteso. L'accordo complessivo tra i laboratori e tra i laboratori IZSVE è ottimo.

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

**Tabella 1: dati grezzi**

codice lab. / campioni	1	2/2*	4	6	11	12	14	15	18
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10	Neg / pos BHV-4	Neg / pos BHV-4	Neg / pos BHV-4	Neg / pos BHV-4	Neg/ pos BHV-4	Neg / pos BHV-4	Neg/ pos BHV-4	Neg/ pos BHV-4	Neg/ pos BHV-4

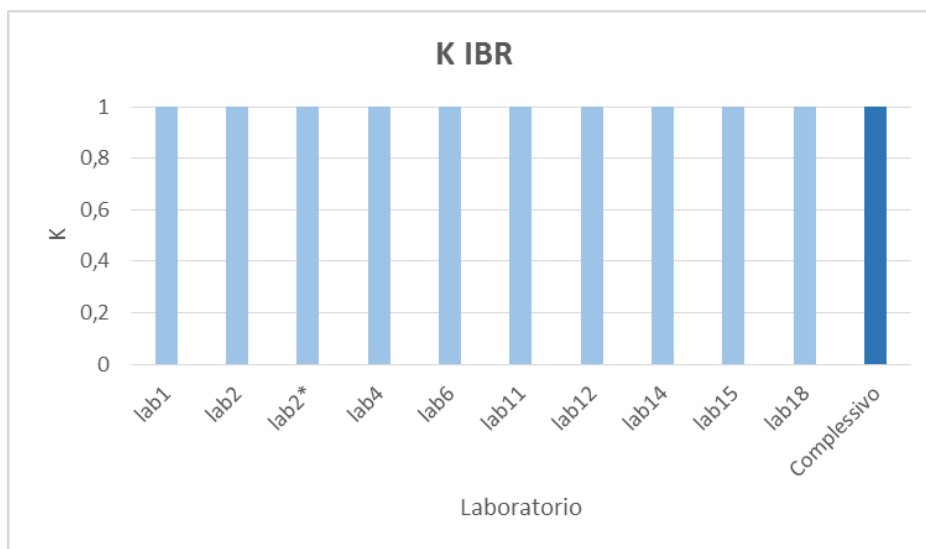
Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso, eccetto che per il lab 6. Per il lab n.6, infatti, il risultato del campione n.10 esito è concorde solo parzialmente, dipende sostanzialmente dal bersaglio genico, rilevato dai primer e sonda impiegati. Se si tratta di frammento genico BHV-1 specifico, infatti, il risultato atteso sarebbe stato negativo,

mentre se il bersaglio della reazione è un frammento genico comune agli herpesvirus bovini, allora anche il lab. 6 avrebbe ottenuto un risultato sovrapponibile all'atteso. Si consiglia al laboratorio n.6 una verifica del bersaglio della reazione della coppia di primer e sonda per garantire la specificità del sistema adottato.

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

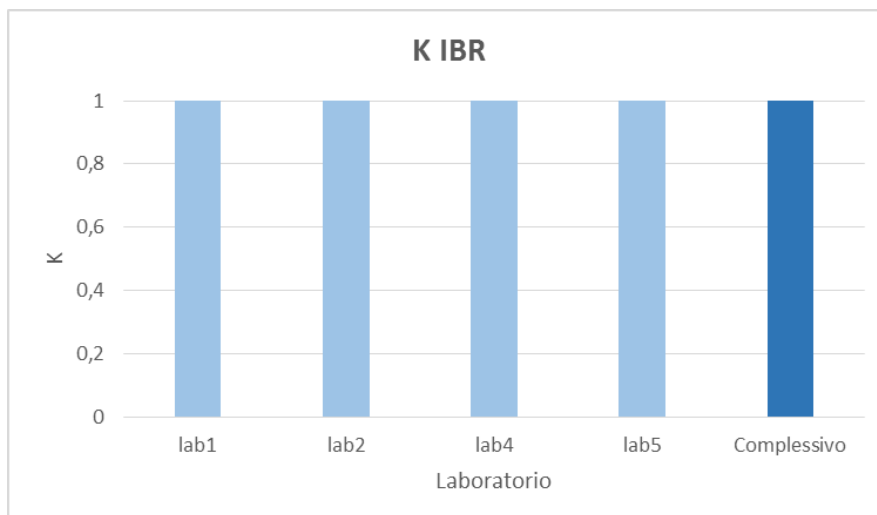
	lab 1	lab 2	lab 2*	lab 4	lab 6	lab 11	lab 12	lab 14	lab 15	lab 18	complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000

\*: operatore estrattore automatico King Fisher Flex (Thermo Fisher).



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

	lab1	lab 2	lab 4	lab 5	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000



Tutti i laboratori hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'atteso. L'accordo complessivo tra i laboratori è ottimo così pure quello tra i laboratori IZS-Ve.

Nella valutazione dell'accordo complessivo, il laboratorio 2 contribuisce solo con gli esiti ottenuti dall'estrazione classica, non automatizzata, ma questi sono sovrapponibili con quelli dell'estrazione manuale.

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

**Tabella 1: dati grezzi**

codice lab./campioni	1	2/2*	4	5	8	10	12	13	14	17
1°	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	neg	neg	neg	neg	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/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	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

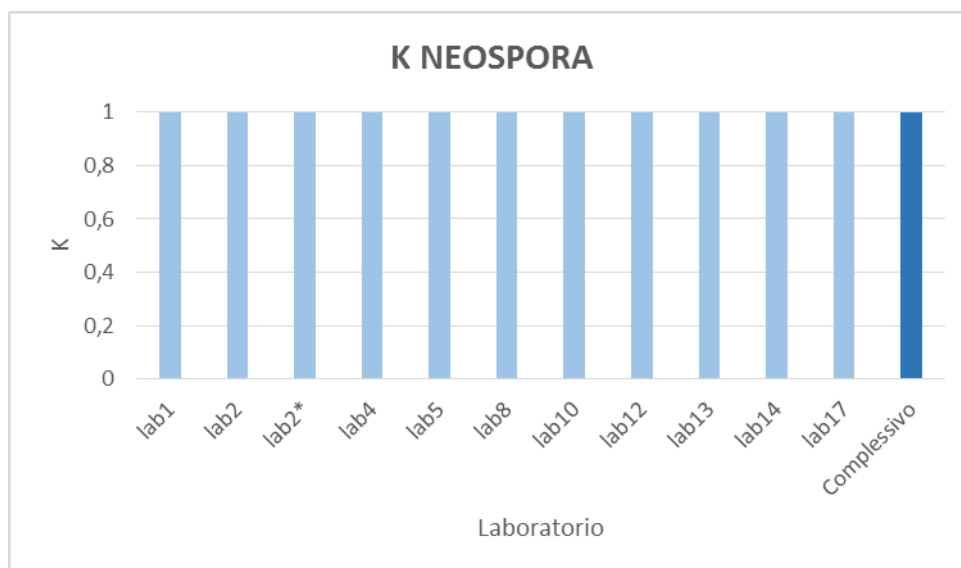
Organo °: positivo Toxoplasma.

\*: operatore estrattore automatico King Fisher Flex (Thermo Fisher).

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

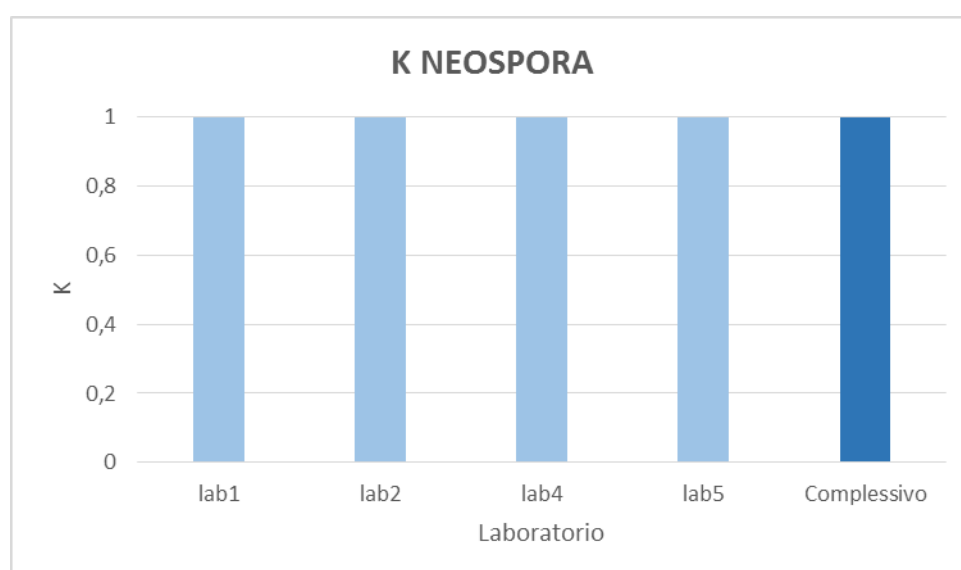
**Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti**

	lab 1	lab 2/2*	lab 4	lab 5	lab 8	lab 10	lab 12	lab 13	lab 14	lab 17	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	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 2/2*	lab 4	lab 5	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000



Tutti i laboratori hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'esito atteso. L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori e solo sui laboratori IZSVe è ottimo.

Nella valutazione dell'accordo complessivo, il laboratorio 2 contribuisce solo con gli esiti ottenuti dall'estrazione classica, non automatizzata, ma questi sono sovrapponibili con quelli dell'estrazione manuale.



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

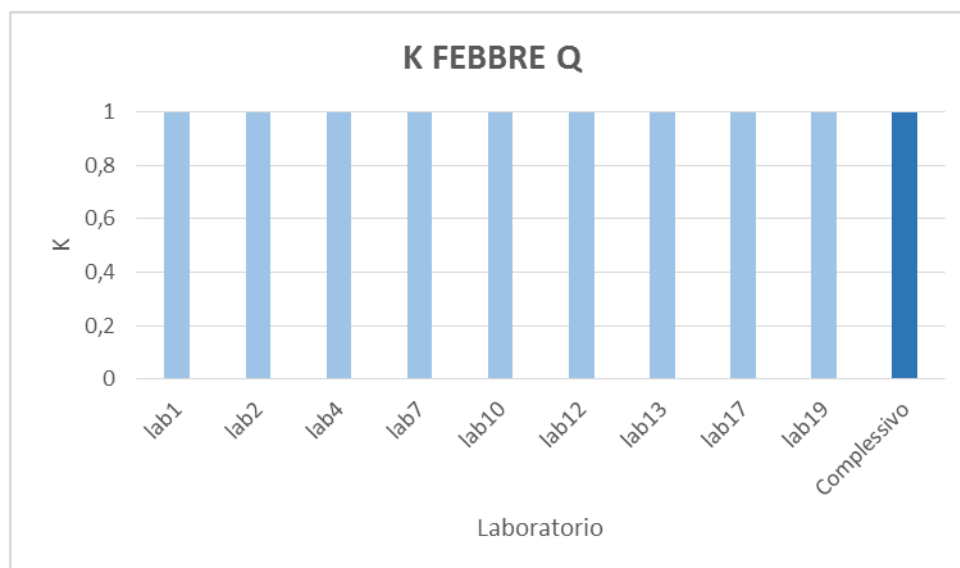
Tabella 1: dati grezzi

codice lab. /campioni	1	2	4	7	10	12	13	17	19
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

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

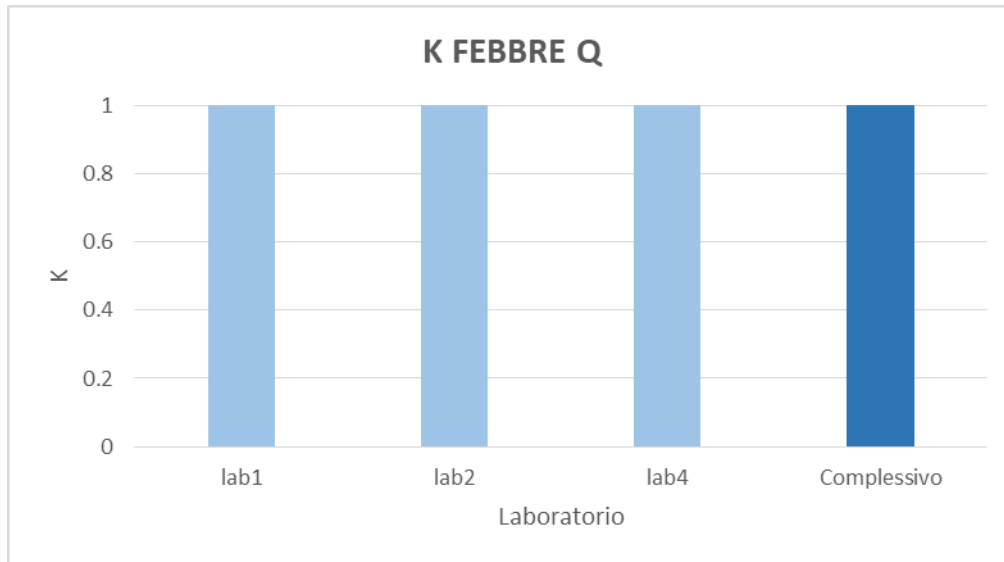
Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	lab1	lab2	Lab4	Lab7	Lab 10	Lab 12	Lab 13	Lab 17	Lab 18	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>p-value</b>	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	lab4	Complessivo
Kappa	1	1	1	1
p-value	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000



Tutti i laboratori hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'esito atteso. L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori e solo sui laboratori IZSVe è ottimo.

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

Tabella 1: dati grezzi

codice lab. /campioni	2	3	11	14	16
1	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos
4	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	pos	pos	pos	pos
6	pos	pos	pos	pos	pos
7	neg	neg	neg	neg	neg
8	pos	pos	pos	pos	pos
9	neg	Pos	neg	neg	neg
10	pos	pos	pos	pos	pos

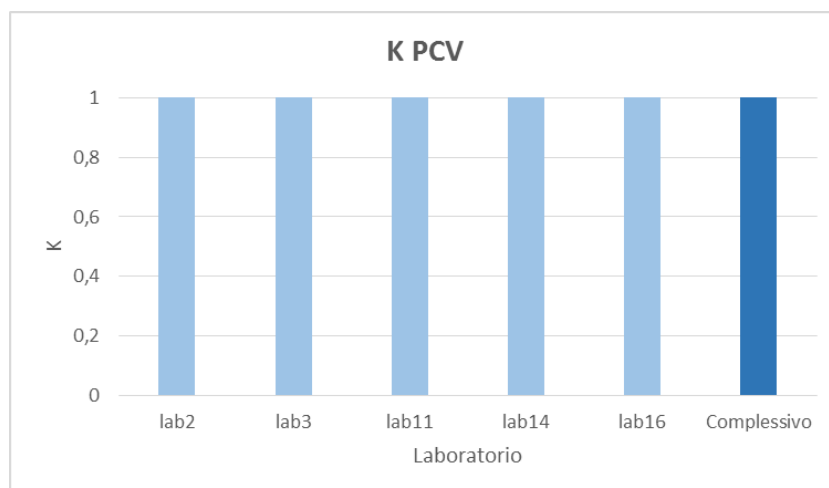
\*neg in classica/ pos in real time PCR.

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

Pur se discordante dall'atteso, l'esito del campione n.9 è stato valutato a parte per l'analisi statistica. Questo campione è stato considerato "positivo borderline" al limite della sensibilità del metodo; nelle prime 2 prove di stabilità è risultato debolmente positivo, pertanto è stato incluso nel pannello, ma nell'ultima prova di stabilità (eseguita allo scadere del termine di consegna degli esiti) e in 4 laboratori su 5, ha dato esito negativo. Di conseguenza, siccome il risultato non correttamente identificato è ascrivibile al campione dimostratosi instabile, e non ai laboratori esecutori, nell'analisi statistica questo dato non è stato considerato.

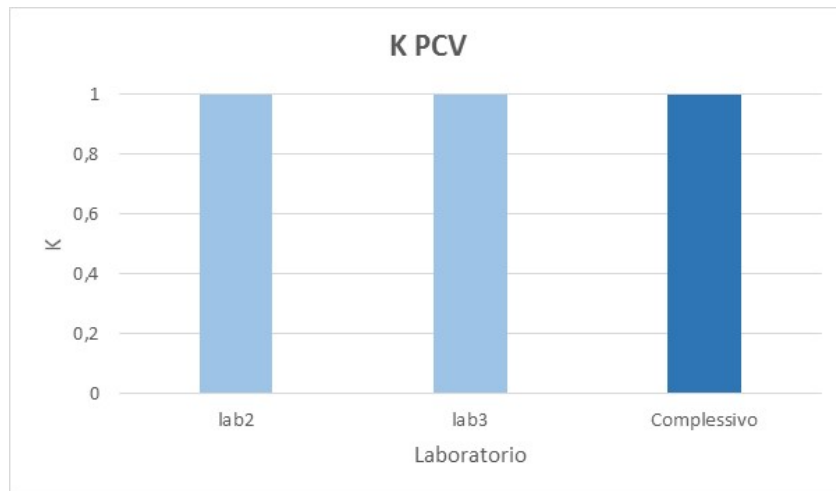
Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti

	lab 2	lab 3	lab 11	lab 14	lab 16	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0000



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

	lab 2	lab 3	Complessivo
Kappa	1	1	1
p-value	0,0008	0,0008	0



Tutti i laboratori presentano un K significativo e ottimo. L'accordo complessivo e l'accordo dei laboratori IZSVE è ottimo.

## 5.2 - CONCLUSIONI

Come si può evincere dai grafici e dalle tabelle sopra rappresentate, l'andamento degli schemi relativi alla diagnosi di Febbre Q, IBR e *Neospora caninum* mostra che tutti i protocolli impiegati, sono da considerarsi equivalenti e validi per lo scopo prefissato.

Il solo lab. 11 dimostra una minore sensibilità nello schema della PRRSV per non aver rilevato 1 campione positivo costituito da un un organo diluito 1:10. Avendo questo laboratorio impiegato un protocollo di RT-PCR real time commerciale, la mancata rilevazione potrebbe essere ascrivibile ad un deficit nell'estrazione di questo campione oppure ad un problema di rilevazione del ceppo per mismatch con la sonda del sistema del kit commerciale.

Relativamente allo schema (BM02/18) per la diagnosi di BHV-1 (IBR), il laboratorio 6 ha indicato come positivo un campione che non era positivo per BHV-1, bensì per BHV-4, il campione non è stato considerato come errato, poiché la sua reattività dipende dalla specificità della coppia di primer usati per l'amplificazione; infatti, se questi individuano un frammento genico conservato tra tutti gli herpesvirus, allora il campione risulterebbe correttamente positivo. Si consiglia al laboratorio 6 di valutare la specificità dei primer impiegati nel metodo interno impiegato.

Relativamente allo schema (BM 05/18) per la diagnosi di circovirus suino tipo 2, il campione 9 ha avuto problemi di stabilità, perciò trattandosi di un campione borderline i risultati in 4/5 non sono stati considerati nell'analisi statistica come già discusso nel paragrafo relativo e la sua mancata identificazione non può essere attribuita ai laboratori partecipanti

Fatte salve le eccezioni per pochissimi casi in alcuni laboratori partecipanti, il trend del Circuito Aqua è comunque positivo per la maggior parte degli schemi proposti con un valore di concordanza da buono ad ottimo.

## 6 – TERMINI E ABBREVIAZIONI

IBR: virus della rinotracheite infettiva del bovino

BHV-1: herpes virus bovino tipo 1

PRRSV: virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino

PCV: circovirus suino tipo 2

pos: positivo

neg: negativo

## 7 – NOTE

L'organizzatore ha considerato le prove dei laboratori equivalenti tra loro.

### FINE REPORT DEFINITIVO

Data report definitivo 06/05/2020

**Responsabile circuito interlaboratorio  
Dr. Stefano Nardelli**