

# Aqua

Circuito interlaboratorio  
per l'assicurazione qualità  
dei risultati

Circuito diagnostica bovina e suina mediante tecniche biomolecolari  
**Report definitivi schemi BM01-19, BM03-19, BM04-19, BM05-19**  
Settembre 2021



## Circuiti interlaboratorio Aqua BM



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

Aqua BM01-19, BM03-19, BM04-19, BM05-19

**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, 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 dell'RNA del virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV) mediante RT-PCR (ORF 7).
- Rilevazione del DNA di *Neospora caninum* mediante PCR (regione conservata del gene codificante per la subunità piccola 18S del rRNA).
- 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. A partire da quest'anno lo schema per la diagnosi di BHV-1 non è stato più offerto nell'ambito del Circuito Aqua, poiché viene organizzato annualmente dal Centro di Referenza Nazionale, sito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e Marche, sede di Perugia.

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 (BM1/19)	7
PCR Neospora (BM3/19)	10
<i>Coxiella b.</i> (BM4/19)	10
PCR PCV2 (BM5/19)	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 cui è riferito il patogeno ricercato (ad es: PCV2 al posto di BM05/19), la tipologia della matrice di quel campione (ad es. siero/ cellule/ organo/ latte /DNA) e un numero che identifica quel campione (es: 99), 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 in altri casi abbiamo utilizzato ceppi virali di referenza (ad es. PRRSV ceppo EU e AM), propagati in colture cellulari competenti 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 la scala 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 2019, 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 liofili, pertanto non vengono prescritte delle modalità di risospensione. All'atto dell'invio dei pannelli a ciascun laboratorio partecipante è indirizzata in allegato una lettera 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, una migliore 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 2020**. Quest'anno, tuttavia, non tutti i laboratori hanno potuto rispettare la data di consegna degli esiti, per motivi diversi; inoltre 3 laboratori hanno richiesto nuovi pannelli per 3 schemi (1 per BM01/19, 1 per BM 4/19 e 1 per BM5/19). Infine la recente pandemia non ha semplificato l'esecuzione di questi schemi inviati in un secondo momento, a causa del ritardo dei rifornimenti e del lockdown, pertanto i report parziali sono stati inviati ai partecipanti con tempistiche diverse rispetto al previsto e l'elaborazione statistica per la stesura del report definitivo è stata possibile soltanto nello scorso mese di agosto.

### 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" (BM01/19) contiene 10 provette costituite da campioni di omogenati d'organo, sieri e lisati cellulari infetti.

RT-PCR PRRS	BM01/19	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Organo positivo ceppo PRRSV EU, (cluster Italian-like) non diluito	<b>positivo EU Italian-like</b>
2	Organo positivo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
3	Cellule infette con ceppo di PRRSV AME diluite 1:10	<b>positivo AME</b>
4	Organo negativo	<b>negativo</b>
5	Organo positivo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
6	Cellule infette con ceppo di PRRSV AME diluite 1:100	<b>positivo AME</b>
7	Organo positivo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
8	Organo positivo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
9	Organo positivo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
10	Cellule infette con ceppo di PRRSV AME diluite 1:10, lotto 01-10	<b>positivo EU</b>

Lo schema "Neospora" (BM03/19) contiene 10 provette: tutti i campioni sono costituiti da omogenati d'organo.

PCR <i>Neospora caninum</i>	BM03/19	
Campione	Descrizione dei campioni	Valore atteso
1	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>
2	Estratto di cervello positivo per Neospora diluito	<b>positivo</b>
3	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>
4	Estratto di cervello negativo per Neospora	<b>negativo</b>
5	Estratto di cervello positivo per Neospora diluito	<b>positivo</b>
6	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>

7	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>
8	Estratto di cervello positivo per Neospora diluito	<b>positivo</b>
9	Estratto di organo negativo per Neospora e positivo per Toxoplasma°	<b>Negativo NEO Positivo TOXO</b>
10	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>

Organo °: positivo Toxoplasma.

Lo schema "FQ" (BM04/19) conteneva 10 provette, 3 delle quali sono costituite da DNA (20µl) già estratto. Diversamente, erano da estrarre, secondo le normali procedure di laboratorio, gli altri 7 campioni che sono costituiti da 3 campioni di latte e 4 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.

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

Lo schema "PCV2" (BM05/19) contiene 10 provette contenenti campioni costituiti da 2 siero e da 8 omogenati d'organo.

<b>PCR <i>circovirus tipo 2</i></b>		<b>BM05/19</b>	
<b>Campione</b>	<b>Descrizione dei campioni</b>	<b>Valore atteso</b>	
1	Estratto d'organo positivo per PCV2, diluito 1:1000	<b>positivo</b>	
2	Estratto d'organo negativo per PCV2	<b>negativo</b>	
3	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	<b>positivo</b>	
4	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	<b>positivo</b>	
5	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	<b>positivo</b>	
6	Siero positivo per PCV2, non diluito	<b>positivo</b>	
7	Estratto d'organo positivo per PCV2, non diluito	<b>positivo</b>	
8	Estratto d'organo positivo per PCV2, non diluito	<b>positivo</b>	
9	Estratto d'organo positivo per PCV2, diluito 1:100	<b>positivo</b>	
10	Siero negativo per PCV2, non diluito	<b>negativo</b>	

#### 4 – DETERMINAZIONE DEI VALORI ASSEGNATI

##### Riservatezza

Per garantire la riservatezza dei dati, i laboratori sono identificati in modo anonimo. A ciascun laboratorio è attribuito 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 BM01-19							
	lab2	lab3	Lab9	Lab11	lab14	lab14#	lab15	lab 16
1	424	244	438	472	655	233	521	697
2	746	248	777	216	718	545	739	608
3	581	668	56	626	665	100	427	670
4	16	754	191	408	239	687	617	241
5	22	724	12	749	755	431	402	40
6	646	405	147	146	421	811	77	513
7	135	504	535	37	311	729	249	441
8	358	355	203	422	95	274	197	385
9	205	675	118	523	157	428	351	347
10	320	633	800	207	429	507	662	13

#SECONDO INVIO

campione	NEO BM03-19									
	lab1	lab2	Lab4	lab5	lab8	lab10	lab12	lab13	lab14	lab17
1	332	511	730	291	53	500	834	827	620	660
2	109	595	433	194	308	138	267	789	845	430
3	478	682	201	404	849	390	214	246	317	25
4	106	361	344	485	78	635	641	271	578	799
5	719	222	333	91	627	518	266	654	365	780
6	588	403	341	386	658	710	601	309	600	829
7	726	436	71	779	319	480	263	776	388	538
8	532	340	727	793	808	823	512	704	801	666
9	548	19	156	318	524	454	531	451	745	505
10	328	552	648	62	33	280	833	680	356	763

campione	FQ BM04-19										
	lab1	lab2	lab4	lab7	lab10	lab12	lab13	lab17	lab18	lab19	lab19#
1	664	208	590	630	287	144	661	112	179	606	193
2	339	465	374	336	133	817	549	694	623	771	457
3	48	614	470	728	544	667	140	844	262	206	824
4	396	659	775	725	562	520	412	766	557	134	705

5	469	772	342	803	387	634	255	245	715	443	501
6	783	218	450	223	122	369	220	238	484	461	282
7	495	83	489	563	312	432	490	381	598	391	154
8	814	395	415	160	499	27	821	406	832	599	88
9	360	165	622	698	234	257	706	444	394	826	303
10	301	434	437	571	306	345	32	20	452	542	603

#SECONDO INVIO

campione	PCV2 BM05-19				
	lab2	lab3	lab11	lab14	lab16#
1	652	848	276	370	474
2	640	327	230	554	791
3	576	286	467	168	192
4	762	296	99	830	528
5	34	41	609	709	290
6	649	678	297	215	645
7	689	292	171	382	213
8	254	820	174	93	141
9	717	411	753	132	594
10	401	44	553	625	397

#SECONDO INVIO

## 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 2019, 18 laboratori hanno aderito al circuito interlaboratorio Aqua per le analisi di biologia molecolare (BM) nell'ambito delle specie bovine e suine. Tutti i laboratori hanno fatto pervenire i dati ottenuti che sono stati analizzati come precedentemente descritto, eccetto un laboratorio che deciso di non eseguire le analisi per lo schema, nonostante fosse inizialmente iscritto. Inoltre, in tre casi sono stati richiesti dei nuovi pannelli per ragioni diverse uno dall'altro laboratorio richiedente. Queste richieste e l'attesa dei nuovi risultati hanno rallentato la fase di elaborazione dei dati restituiti, oltre alla ben nota pandemia da Covid-19 che ha assorbito ed impegnato tutte le risorse disponibili in Istituto, compreso il nostro laboratorio.

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. In caso di doppio invio ad un laboratorio, nel calcolo statistico viene incluso quanto restituito dopo analisi del primo invio, per uniformità con i restanti laboratori partecipanti. L'analisi dei dati ottenuti con nuovi pannelli è quindi a carico del laboratorio richiedente.

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

**Tabella 1: dati grezzi**

codice lab. /campioni	2	3	9	14	14 – secondo invio	15	16
1	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	Negativo	pos EU	pos EU
2	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
3	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	pos EU	pos EU	pos EU	Negativo	pos EU	pos EU	pos EU
6	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME
7	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU/ AME*
8	pos EU	pos EU	pos EU	Negativo	pos EU	pos EU	pos EU
9	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
10	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME	pos AME

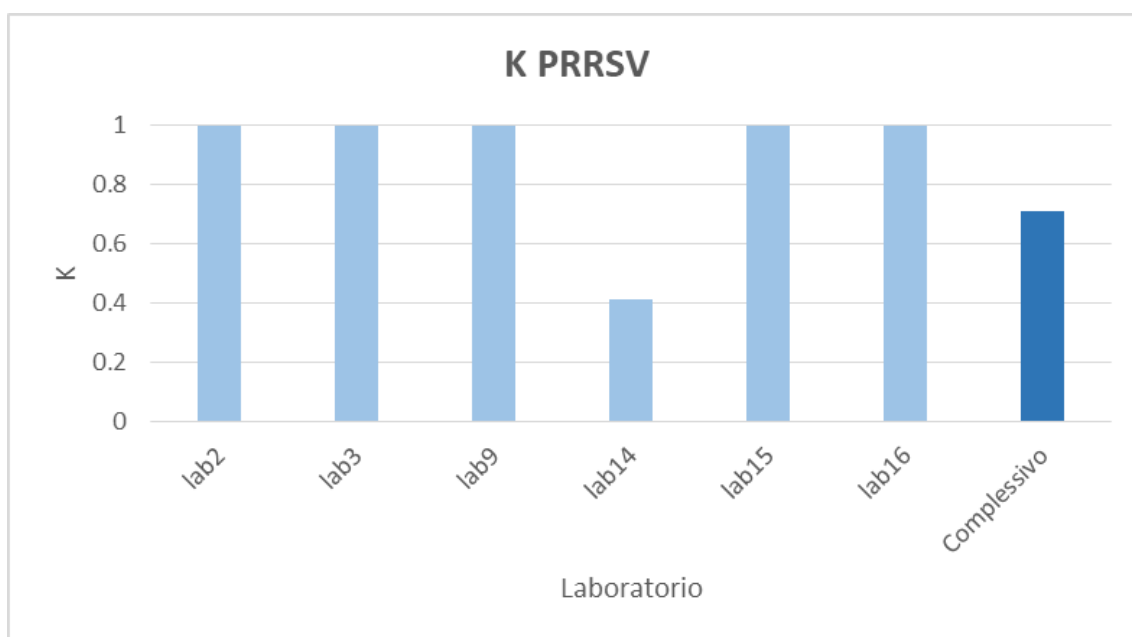
Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

**Esito discordante dall'atteso.**

\*il risultato viene considerato accettabile in quanto parzialmente sovrapponibile all'atteso, anche se non totalmente, infatti la presenza dell'altro ceppo non è attesa.

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

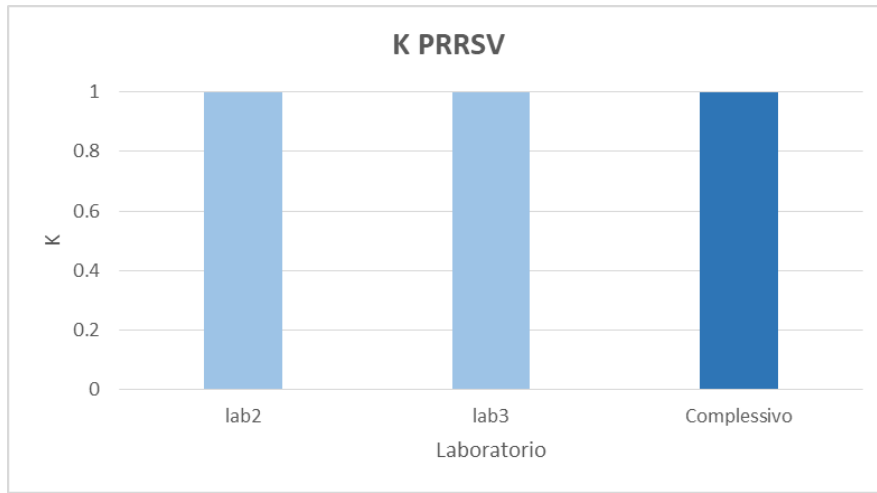
	lab2	lab3	lab9	lab14	lab15	lab16	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	0.4118	1	1	0.7115
<b>p-value</b>	0.0008	0.0008	0.0008	0.0537	0.0008	0.0008	0



Tutti i laboratori presentano un K significativo e ottimo ad eccezione del laboratorio 14 che presenta un accordo moderato con l'esito atteso e al limite della significatività. Il laboratorio 14 ha chiesto la ripetizione dell'analisi ed ha ottenuto un accordo buono con l'atteso (K=0.6154; p-value=0.0175). L'accordo complessivo tra i laboratori è buono.

**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 IZSVE presentano un K significativo e ottimo. L'accordo complessivo tra i laboratori IZSVE è ottimo.

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

**Tabella 1: dati grezzi**

codice lab. /campioni	1	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	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6°										
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9°	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO	neg/ TOXO
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**

	lab1	lab2	lab4	lab5	lab8	lab10	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

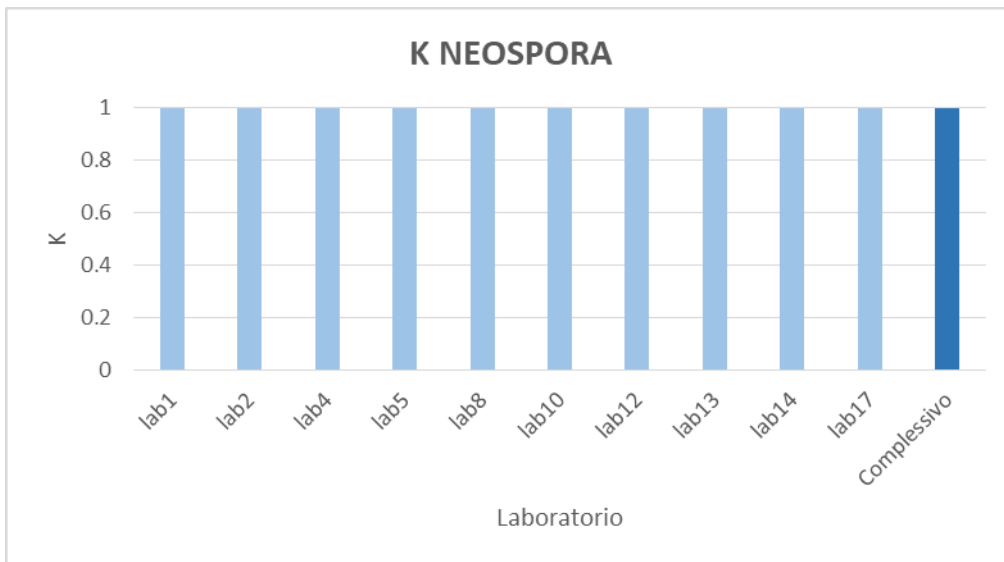
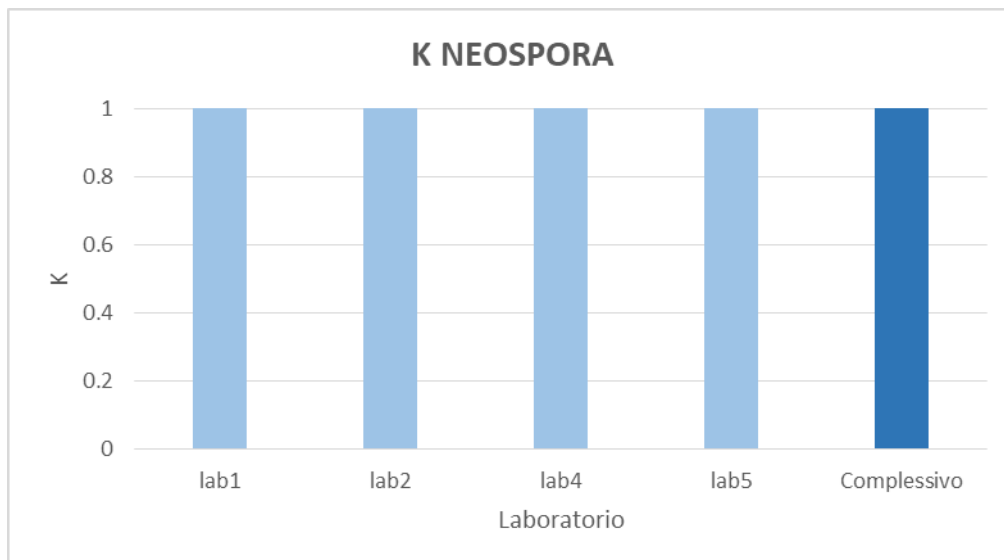


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZSVe

	lab1	lab2	lab4	lab5	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 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	18	19	19 – secondo invio
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	neg	neg	neg	dubbio	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg
9	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos

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

Esito discordante dall'atteso.

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

	lab1	lab2	lab4	lab7	lab10	lab 12	lab 13	lab 17	lab 18	lab 19	complessivo
Kappa	1	1	1	0.7778	1	1	1	1	1	0.0476	0.7651
p-value	0.0008	0.0008	0.0008	0.0014	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.0008	0.4402	0.0000

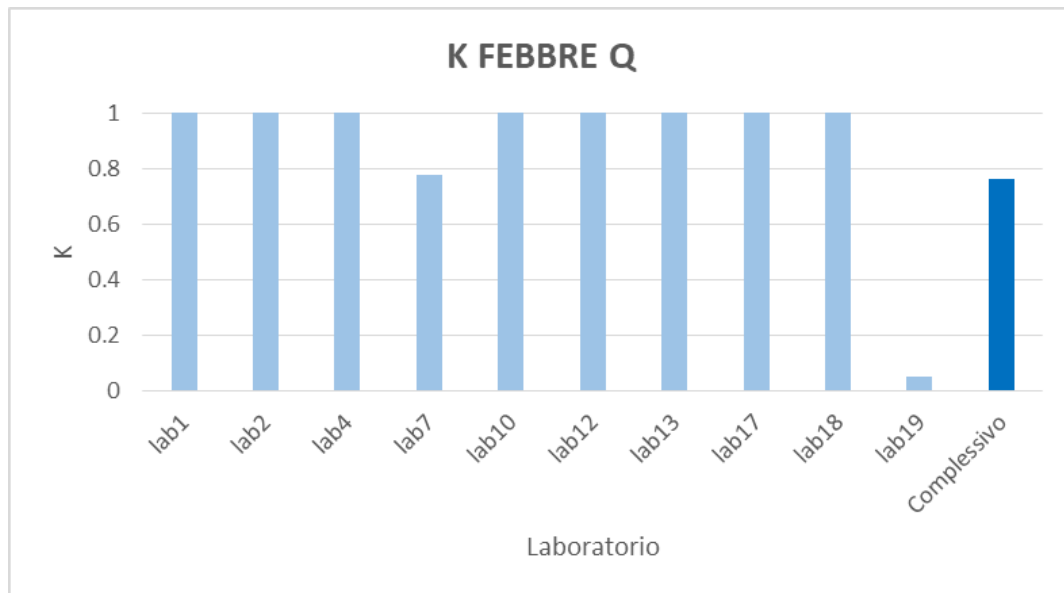
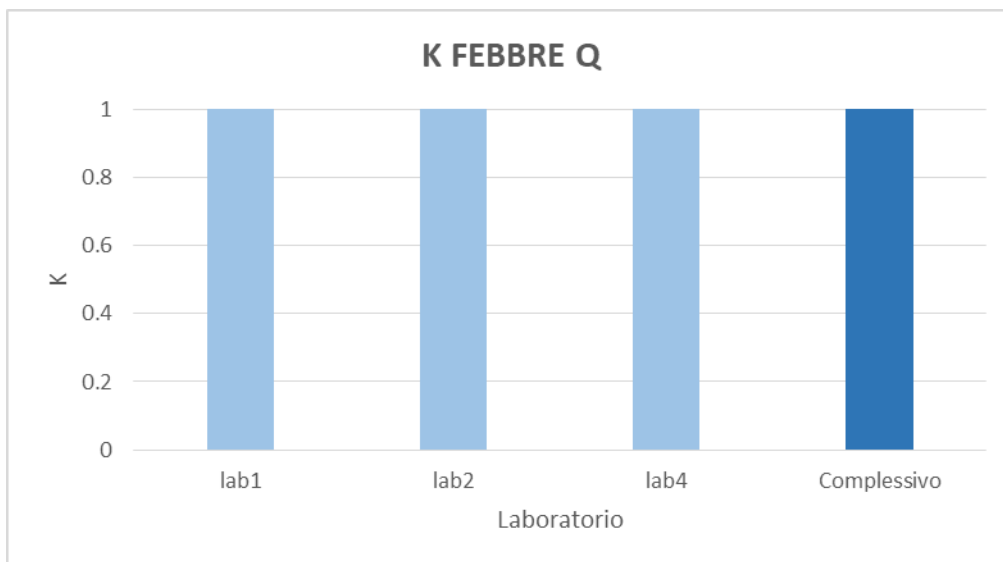


Tabella 3: valori K e p-value per i laboratori IZSVe

	lab 1	lab 2	lab4	Comlessivo
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, ad eccezione dei laboratori 7 e 19. Il laboratorio 7 ha un buon accordo con l'atteso, mentre il laboratorio 19 ha manifestato qualche difficoltà nell'identificazione della Febbre Q, tale da valutare l'accordo dovuto al caso ( $p\text{-value} > 0.05$ ). Il laboratorio 19 ha chiesto la ripetizione dell'analisi ed ha ottenuto un accordo ottimo con l'atteso ( $K=1$ ;  $p\text{-value}=0.008$ ). L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori è buono.

Tutti i laboratori IZSVe hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'esito atteso. L'accordo complessivo calcolato 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 secondo invio#
1	pos	pos	pos	pos	pos
2	neg	deb pos	neg	deb pos	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos
6	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos
8	pos	pos	pos	pos	pos
9	pos	pos	pos	pos	pos
10	neg	deb pos	neg	neg	neg

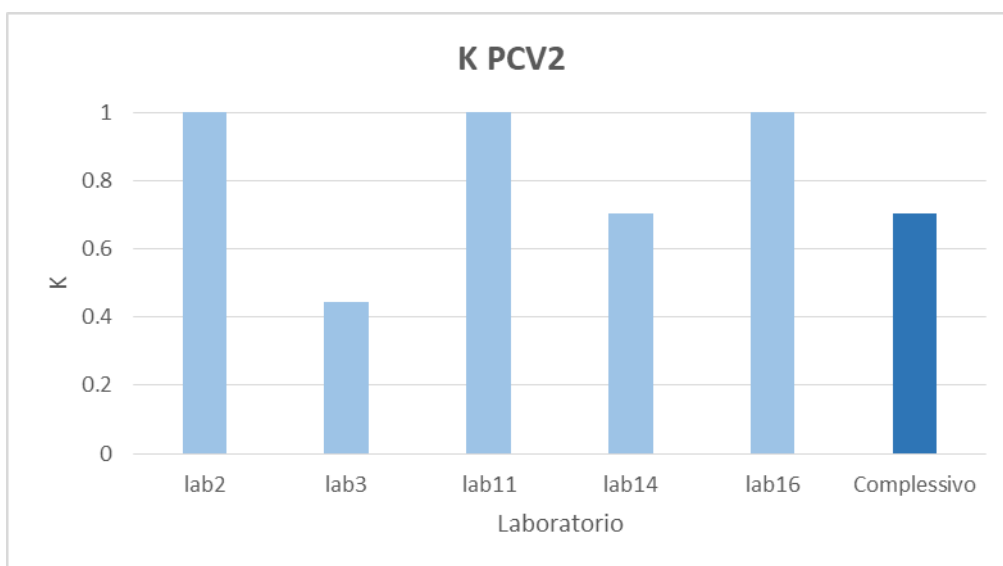
Esito concorde per tutti i laboratori e con l'atteso.

# In questo caso il laboratorio 16 ha chiesto un secondo invio prima di inviare gli esiti del primo pannello e quindi prima di ricevere il report parziale, per questa ragione sono stati considerati nell'elaborazione i risultati del lab 16 ottenuti nel secondo pannello inviato.

**Esito discordante dall'atteso.**

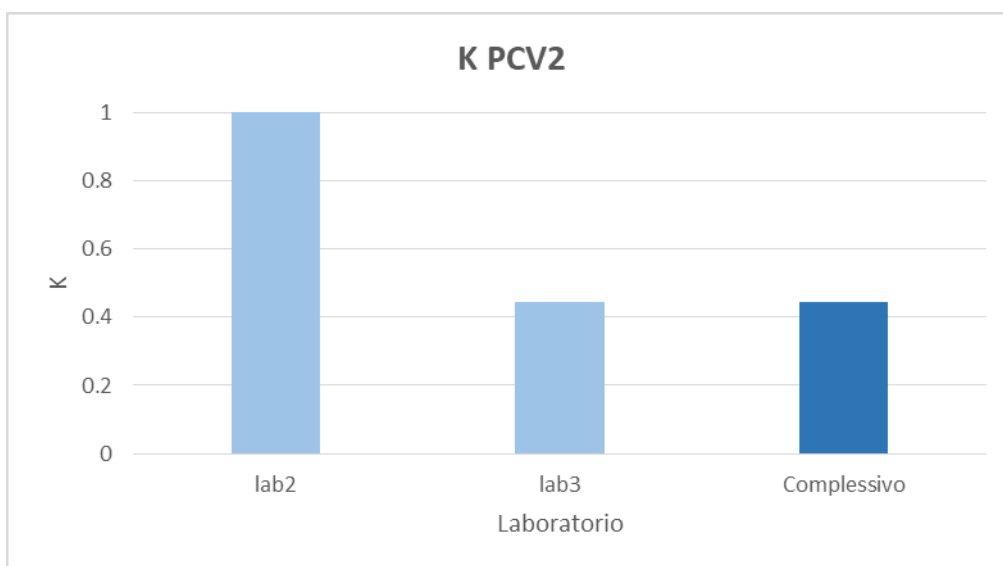
**Tabella 2: valori K e p-value per tutti i laboratori partecipanti**

	lab2	lab3	lab11	lab14	lab16	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	0.4444	1	0.7059	1	0.7031
<b>p-value</b>	0.0008	0.0008	0.0008	0.0015	0.0008	0.0000



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

	lab2	lab3	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	0.4444	0.4444
<b>p-value</b>	0.0008	0.0008	0.0008



Tutti i laboratori presentano un K significativo, tuttavia mentre i laboratori 2, 11 e 16 hanno un ottimo accordo con l'esito atteso, il laboratorio 14 ha un accordo buono e il laboratorio 3 un accordo moderato. L'accordo complessivo tra i laboratori è buono. Entrambi i laboratorio IZSVe presentano un K significativo, ma mentre il laboratorio 2 presenta un accordo ottimo con l'atteso, il laboratorio 3 mostra un accordo moderato. Tra i due laboratori la concordanza è pertanto moderata.

## 5.2 - CONCLUSIONI

Come si può evincere dai grafici e dalle tabelle sopra rappresentate, l'andamento degli schemi Aqua 2019 ha presentato alcuni problemi per alcuni laboratori, perlopiù risolti con l'invio di un secondo schema, mentre quello relativo alla diagnosi *Neospora caninum* mostra che tutti i protocolli impiegati, sono da considerarsi equivalenti e validi per lo scopo prefissato.

Relativamente allo schema relativo alla diagnosi di PRRS (BM 01/19), il solo lab. 14 ha dimostrato una minore sensibilità per non aver rilevato 2 campioni positivi costituiti da matrice organo, verosimilmente ascrivibile ad un problema nella fase di estrazione. Questo problema infatti è stato indagato attraverso l'analisi di un secondo pannello che ha dato esiti migliorativi.

Relativamente allo schema (BM04/19) per la diagnosi di *Coxiella burnetii*, il laboratorio 19 ha manifestato qualche difficoltà nell'identificazione di questo batterio Febbre Q, tale da valutare l'accordo dovuto al caso ( $p\text{-value} > 0.05$ ). Anche in questo caso il laboratorio 19 ha chiesto ed eseguito la ripetizione dello schema e nella successiva analisi ha ottenuto un accordo ottimo con l'atteso, a dimostrazione della efficace risoluzione del problema.

Relativamente allo schema (BM 05/19) per la diagnosi di circovirus suino tipo 2, il laboratorio 16 per un problema tecnico ha chiesto l'invio di un secondo pannello prima della chiusura dei tempi di consegna degli esiti, perciò sono stati inclusi nell'elaborazione i dati ottenuti nel secondo schema inviato. Mentre il laboratorio 3 e 14 hanno rilevato deboli reattività in campioni di organo e siero negativi presenti nel pannello, ascrivibili a potenziali eventi di cross-contaminazione, del tutto casuali e sporadici.

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

## 6 – TERMINI E ABBREVIAZIONI

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 20/09/2021

**Responsabile circuito interlaboratorio**  
**Dr. ssa Letizia Ceglie**