



Circuito interlaboratorio  
per l'assicurazione qualità  
dei risultati



Circuito diagnostica bovina e suina mediante tecniche biomolecolari  
**Report definitivi schemi BM01-21, BM03-21, BM04-21,  
BM05-21**

Aprile 2022



**Piattaforma Diagnostica Molecolare**  
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 BM01-21, BM03-21, BM04-21, BM05-21

**Ente organizzatore:**

**Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie**

**Lab.: Virologia Diagnostica**

**Viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (PD)**

**Responsabile del Circuito interlaboratorio Aqua BM:**

**Dr.ssa Letizia Ceglie**

**[lceglie@izsvenezie.it](mailto:lceglie@izsvenezie.it)**

**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, dalla U.O Piattaforma Diagnostica Molecolare afferente alla Struttura complessa "Diagnostica in Sanità animale" (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 rRT-PCR.
- 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 rPCR (IS1111).
- Rilevazione di DNA di circovirus suino di tipo 2 mediante rPCR (ORF 1).

Sono state sottoposte a *ring test* analisi adottate nella *routine* nei laboratori di biologia molecolare di questo Istituto per diagnosi virologiche e, in un caso, batteriologica e parassitologica. Dal momento che tali indagini sono effettuate con metodiche biomolecolari real-time o end-point (rRT-PCR, PCR r rPCR), presso le U.O. di biologia molecolare dislocate nelle province e regioni di competenza dell'Istituto, questo circuito interlaboratorio è stato proposto anche 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 (BM1/21)	7
PCR Neospora (BM3/21)	6
<i>Coxiella b.</i> (BM4/21)	8
PCR PCV2 (BM5/21)	4

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 BM05/2021), 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 la Struttura Complessa di Diagnostica in Sanità animale. 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 riferimento (ad es. PRRSV ceppo EU e AM), propagati in colture cellulari competenti e controllati preventivamente per le prove oggetto del circuito. Infine, per l'analisi di ricerca di *Coxiella burnetii*, da quest'anno, per uniformarci ad altri colleghi del nostro Istituto impegnati in altri Schemi Aqua, inviamo il pannello in un nuovo conservante/inattivante che mantiene il campione stabile per 7 giorni a temperatura di refrigerazione, denominato PrimeStore MTM, di cui è stata allegata la scheda di sicurezza ai soli laboratori interessati al momento dell'invio.

In genere le provette destinate a tutte le analisi contengono materiale per due estrazioni (circa 450-500µl).

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 giugno 2021, 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, come prova di stabilità nel tempo alle condizioni di conservazione previste per i pannelli, 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.

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 possono verosimilmente inficiare 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 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 anche sull'etichetta posta su ciascuna provetta 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 **2 agosto 2021**. Nel 2021, non tutti i laboratori hanno potuto rispettare la data di consegna degli esiti, per motivi diversi, un laboratorio non ha restituito i risultati e 2 laboratori hanno richiesto nuovi pannelli per 2 schemi (1 per BM01/21 e 1 per BM 4/21). Pertanto i report parziali sono stati inviati ai partecipanti nel mese di agosto e l'elaborazione statistica per la stesura del report definitivo è stata possibile soltanto nello scorso mese di novembre.

### 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" (BM01/21) contiene 10 provette costituite da campioni di omogenati d'organo, sieri e lisati cellulari infetti.

<b>RT-PCR PRRS</b>	<b>BM01/21</b>	
<b>Campione</b>	<b>Descrizione dei campioni</b>	<b>Valore atteso</b>
1	Cellule infette con ceppo di PRRSV NA diluite 1:10000	<b>positivo NA</b>
2	Organo positivo PRRSV EU (cluster Italian-like) non diluito	<b>positivo EU Italian-like</b>
3	Siero positivo PRRSV EU diluito 1:10	<b>positivo EU</b>
4	Siero suino negativo	<b>negativo</b>
5	Cellule infette con ceppo di PRRSV EU diluite 1:100	<b>positivo EU</b>
6	Siero positivo PRRSV EU non diluito	<b>positivo EU</b>
7	Organo positivo ceppo PRRSV EU, non diluito	<b>positivo EU</b>
8	Cellule infette con ceppo di PRRSV NA diluite 1:1000000	<b>positivo NA</b>
9	Siero positivo PRRSV EU diluito 1:20	<b>positivo EU</b>
10	Organo suino negativo	<b>negativo</b>

Lo schema "Neospora" (BM03/21) contiene 10 provette: tutti i campioni sono costituiti da omogenati d'organo.

<b>PCR Neospora caninum</b>	<b>BM03/21</b>	
<b>Campione</b>	<b>Descrizione dei campioni</b>	<b>Valore atteso</b>
1	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>
2	Estratto di cervello positivo per Neospora diluito 1:3	<b>positivo</b>
3	Estratto di cervello positivo per Neospora non diluito	<b>positivo</b>
4	Estratto di organo bovino negativo	<b>negativo</b>
5	Estratto di cervello positivo per Neospora non 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 1:3	<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" (BM04/21) conteneva 10 provette, in 6 casi si trattava di omogenati d'organo, mentre le 4 rimanenti erano campioni di latte. Per uniformarsi a quanto fatto in altri laboratori del nostro Istituto e per ragioni di sicurezza, tutti i campioni di questo schema sono stati allestiti in 500µl di una nuova soluzione conservante/inattivante in grado di mantenere il campione stabile per 7 giorni a temperatura di refrigerazione, denominata PrimeStore Molecular Transport Medium (EKF Diagnostics for Life). Laddove i campioni allestiti fossero stati diluiti è riportato in tabella.

<b>PCR <i>Coxiella burnetii</i></b>	<b>BM04/21</b>	
<b>Campione</b>	<b>Descrizione dei campioni</b>	<b>Valore atteso</b>
1	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> diluito 1:100000	<b>Positivo</b>
2	Latte positivo per <i>C. burnetii</i> non diluito	<b>Positivo</b>
3	Latte negativo non diluito	<b>Negativo</b>
4	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> diluito 1:10000	<b>Positivo</b>
5	Latte positivo per <i>C. burnetii</i> non diluito	<b>Positivo</b>
6	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> diluito 1:10	<b>Positivo</b>
7	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> diluito 1:1000	<b>Positivo</b>
8	Estratto d'organo bovino negativo	<b>Negativo</b>
9	Estratto d'organo positivo per <i>C. burnetii</i> non diluito	<b>Positivo</b>
10	Latte positivo per <i>C. burnetii</i> non diluito	<b>Positivo</b>

Lo schema "PCV2" (BM05/21) contiene 10 provette contenenti campioni costituiti da 2 siero e da 8 omogenati d'organo diluiti e non diluiti.

<b>PCR <i>circovirus</i> tipo 2</b>	<b>BM05/21</b>	
<b>Campione</b>	<b>Descrizione dei campioni</b>	<b>Valore atteso</b>
1	Estratto d'organo positivo per PCV2 diluito 1:10	<b>positivo</b>
2	Siero positivo per PCV2 diluito 1:10	<b>positivo</b>
3	Estratto d'organo suini negativo	<b>negativo</b>
4	Estratto d'organo positivo per PCV2 diluito 1:100000	<b>positivo</b>
5	Estratto d'organo positivo per PCV2 diluito 1:10	<b>positivo</b>
6	Estratto d'organo positivo per PCV2 non diluito	<b>positivo</b>
7	Siero suino negativo	<b>negativo</b>
8	Estratto d'organo positivo per PCV2, diluito 1:5	<b>positivo</b>
9	Estratto d'organo positivo per PCV2, diluito 1:10	<b>positivo</b>
10	Estratto d'organo positivo per PCV2, diluito 1:10	<b>positivo</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. Infine, si precisa che per i 2 laboratori che ne hanno fatto richiesta ossia il lab 16 (BM01/21) e il lab 17 (BM04/21), la numerazione del secondo invio è stata semplificata da 1 a 10 poiché i pannelli richiesti appartenevano a 2 schemi differenti e tra i laboratori non c'era possibilità di errata identificazione, né di errata decodifica da parte del laboratorio organizzatore.

##### TABELLE DI DECODIFICA DEI CAMPIONI PER SCHEMA

campione	PRRS BM01-21						
	lab2	lab3	Lab9	Lab11	lab14	lab15	lab 16
1	398	800	161	574	878	222	10
2	351	7	845	401	210	22	433
3	154	37	262	264	603	45	869
4	335	90	234	804	294	265	617
5	472	119	529	59	633	541	487
6	374	523	714	309	770	256	501
7	614	874	704	843	318	443	725
8	146	654	167	362	282	115	610
9	188	311	91	474	273	376	271
10	421	217	587	653	571	373	162

campione	NEO BM03-21						
	lab2	Lab4	lab5#	lab10	lab12	lab13	lab17
1	620	363	440	508	73	547	609
2	138	715	41	216	583	772	275
3	81	419	605	542	895	426	329
4	720	100	263	416	112	643	249
5	762	754	627	60	291	494	519
6	258	705	128	884	506	182	602
7	575	632	324	191	431	16	155
8	761	209	211	852	366	175	797
9	703	460	33	818	109	391	625
10	30	568	493	744	406	679	384

#Esiti non ricevuti

campione	FQ BM04-21							
	lab2	lab4	lab7	lab10	lab12	lab13	lab17	lab18
1	165	689	639	102	816	306	464	544
2	619	731	733	308	80	23	34	775
3	97	867	129	120	719	194	43	231
4	139	484	46	803	659	255	796	358
5	235	88	247	9	48	590	657	799
6	634	333	367	491	611	728	811	629
7	281	670	468	397	837	595	478	557
8	111	504	352	600	189	123	489	436
9	137	20	153	293	743	25	246	806
10	635	520	205	671	470	62	581	502

campione	PCV2 BM05-21			
	lab2	lab3	lab14	lab16
1	214	415	684	150
2	284	168	181	563
3	242	279	79	42
4	765	13	357	597
5	220	458	473	730
6	789	618	550	525
7	26	145	598	712
8	394	78	798	674
9	270	492	121	876
10	685	594	156	92

## 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 2021, 14 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, tranne il laboratorio 5 che non li ha mai consegnati. Inoltre, in due 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.

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**

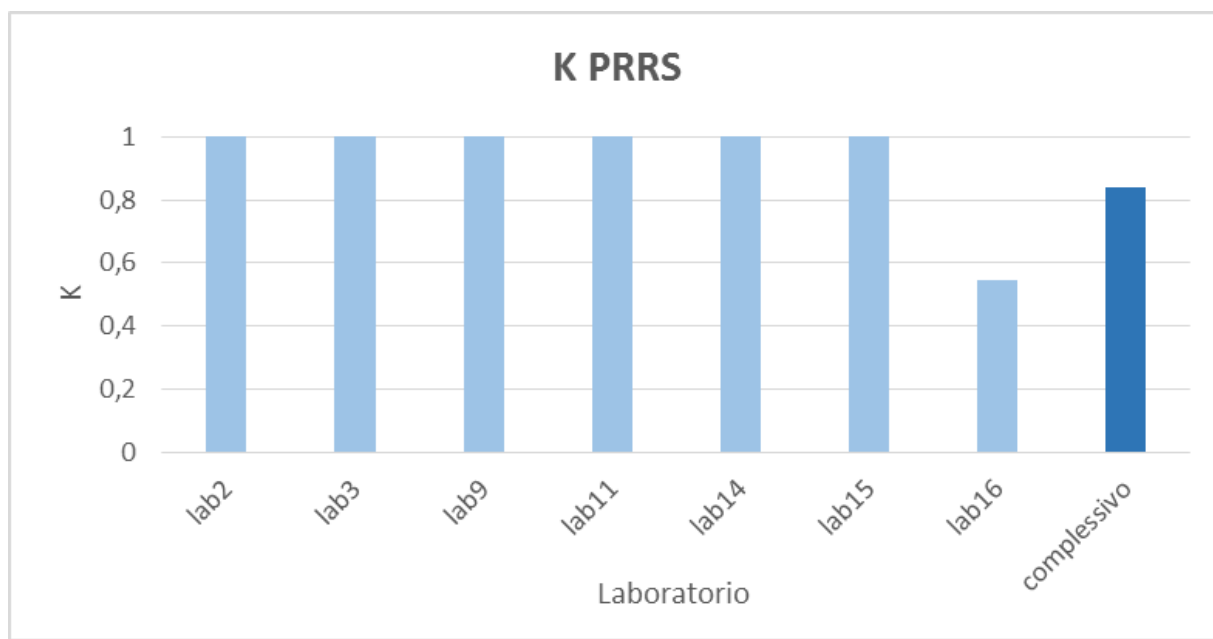
codice lab. /campioni	2	3	9	11	14	15	16
1	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA
2	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
3	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	Negativo
5	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
6	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
7	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	Negativo
8	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA	pos NA	Negativo
9	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU	pos EU
10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

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

**Esito discordante dall'atteso nel primo invio.** Concorde all'atteso nel secondo invio per il lab 16.

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

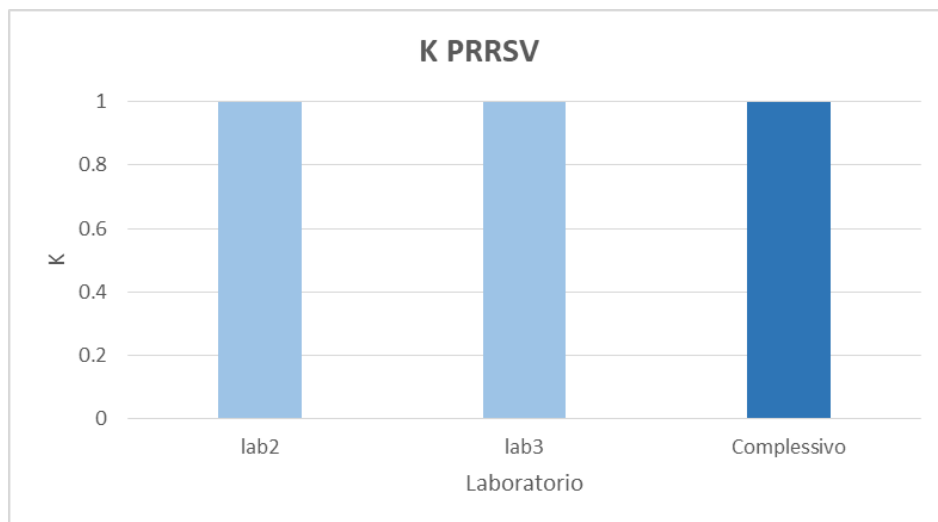
	lab2	lab3	lab9	lab11	lab14	lab15	lab16	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1	1	0,5455	0,838
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0264	0,0000



Tutti i laboratori presentano un K significativo e ottimo ad eccezione del laboratorio 16 che presenta un accordo moderato con l'esito atteso nel primo invio. A seguito di questo risultato, il lab 16 ha chiesto la ripetizione dell'analisi ed ha ottenuto un accordo ottimo con l'atteso. L'accordo complessivo tra i laboratori è comunque ottimo.

**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	2*	4	10	12	13	17
1	pos	pos	pos	neg	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	neg	pos	pos
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	pos	pos	pos	neg	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	pos	pos	pos	pos	pos	pos
9°	Neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO	neg/ pos TOXO
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Organo °: positivo Toxoplasma.

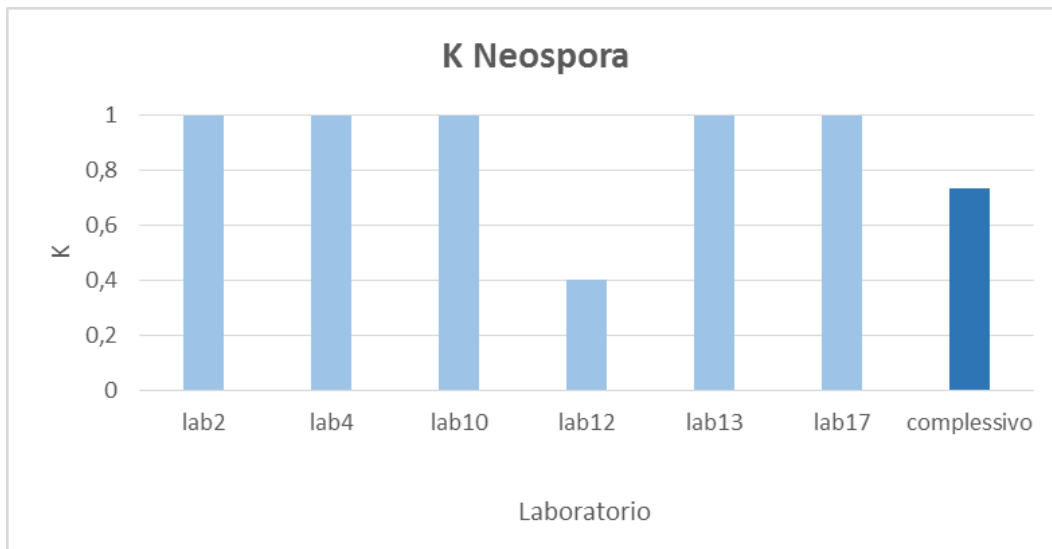
\*: operatore estrattore automatico King Fisher Flex (Thermo Fisher).

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

**Esito discordante dall'atteso.**

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

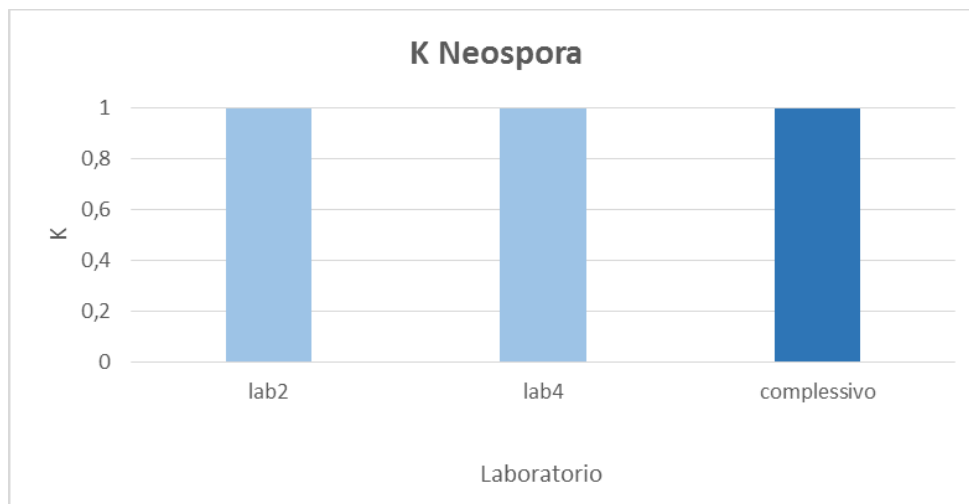
	lab2	lab4	lab10	lab 12	lab 13	lab 17	complessivo
Kappa	1	1	1	0,4	1	1	0,7333
p-value	0.0008	0.0008	0.0008	0,0569	0.0008	0.0008	0,0000



Tutti i laboratori hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'esito atteso, ad eccezione del laboratorio 12 che ha manifestato qualche difficoltà nell'identificazione di *Neospora caninum*, tale da valutare l'accordo osservato dovuto al caso ( $p\text{-value} > 0.05$ ). L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori è buono.

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

	lab2	lab4	Complessivo
Kappa	1	1	1
p-value	0.0008	0.0008	0.0000



Tutti i laboratori IZSVE hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'esito atteso. L'accordo complessivo è ottimo.

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

Tabella 1: dati grezzi

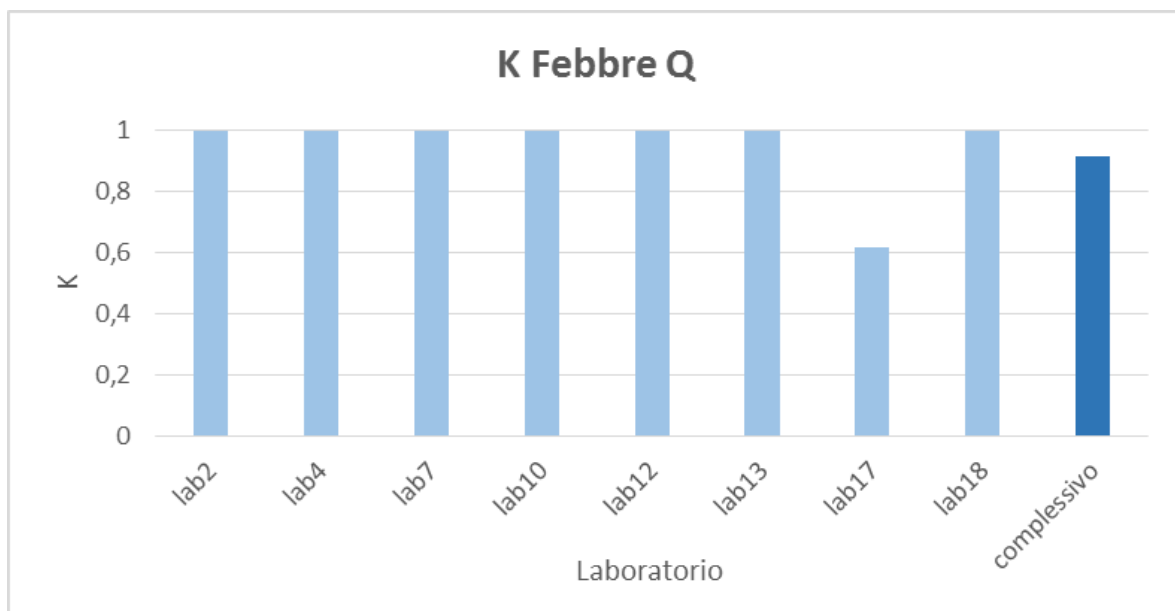
codice lab. /campioni	2	4	7	10	12	13	17	18
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg
9	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

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

**Esito discordante dall'atteso.** Concorde all'atteso nel secondo invio per il lab 17.

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

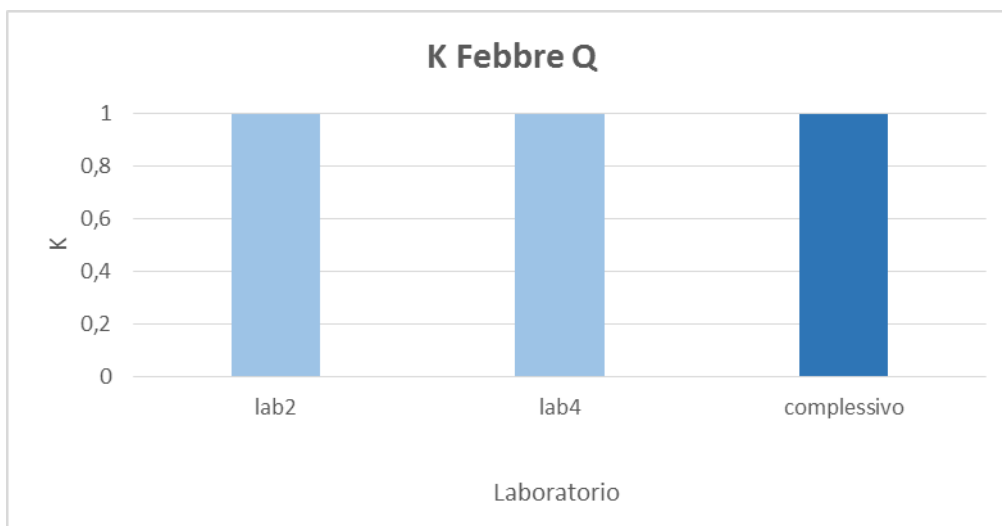
	lab2	lab4	lab7	lab10	lab 12	lab 13	lab 17	lab 18	complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1	1	1	1	0,6154	1	0,9179
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0175	0,0008	0,0000



Tutti i laboratori hanno un K significativo e un ottimo accordo con l'esito atteso ad eccezione del laboratorio 17 che ha un buon accordo. A seguito di questo risultato, il lab 17 ha chiesto la ripetizione dell'analisi ed ha ottenuto un accordo ottimo con l'atteso. L'accordo complessivo calcolato su tutti i laboratori è ottimo.

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

	lab 2	lab4	Complessivo
<b>Kappa</b>	1	1	1
<b>p-value</b>	0,0008	0,0008	0,0000



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**

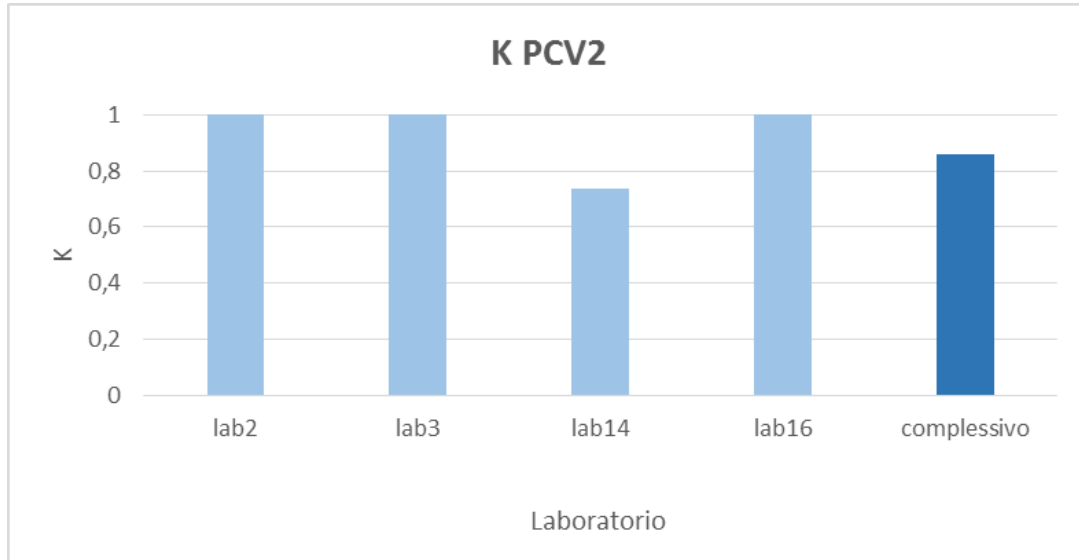
codice lab. /campioni	2	3	14	16
1	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos
3	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos
6	pos	pos	pos	pos
7	neg	neg	neg	neg
8	pos	pos	pos	pos
9	pos	pos	neg	pos
10	pos	pos	pos	pos

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**

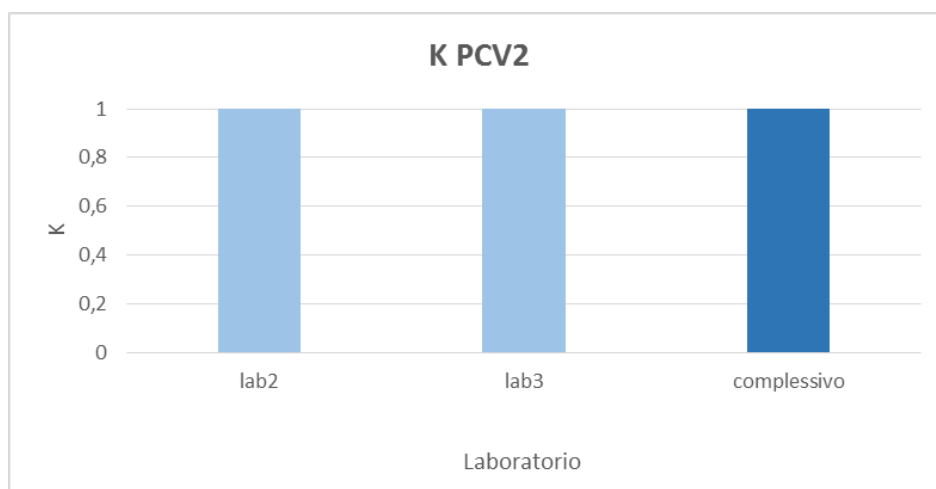
	lab2	lab3	lab14	lab16	Complessivo
Kappa	1	1	0,7368	1	0,8566
p-value	0,0008	0,0008	0,0079	0,0008	0,0000



Tutti i laboratori presentano un K significativo ad eccezione del laboratorio 14 che ha un accordo buono con l'esito atteso. L'accordo complessivo tra i laboratori è ottimo.

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

	lab2	lab3	Complessivo
Kappa	1	1	1
p-value	0,0008	0,0008	0,0008



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

## 5.2 - CONCLUSIONI

Come si può evincere dai grafici e dalle tabelle sopra rappresentate, l'andamento degli schemi Aqua 2021 ha presentato pochi problemi di identificazione corretta dei campioni. Nel caso di 2 laboratori, che hanno richiesto la ripetizione del PT, i problemi sono stati risolti con l'invio di un secondo schema.

Relativamente allo schema relativo alla diagnosi di PRRS (BM 01/21), il solo lab. 16 ha dimostrato una minore sensibilità per non aver rilevato 2 campioni positivi costituiti da matrice organo e lisati cellulari, verosimilmente ascrivibile ad un problema nella fase di estrazione. Questo problema infatti è stato investigato attraverso l'analisi di un secondo pannello che ha dato esiti conformi all'atteso.

Relativamente allo schema (BM04/21) per la diagnosi di *Coxiella burnetii*, il laboratorio 17 ha manifestato un problema di discordanza in un campione, verosimilmente ascrivibile ad un potenziale fenomeno di cross-contaminazione in fase di estrazione, del tutto casuale e sporadico. Anche in questo caso il laboratorio 17 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.

Fatte salve le poche eccezioni descritte 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 complessivo osservato tra i laboratori sempre ottimo, con un'unica eccezione. Nel caso dei laboratori IZSve l'agreement registrato è sempre 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 20/04/2022

Responsabile circuito interlaboratorio  
Dr. ssa Letizia Ceglie

