

# Aqua

Circuito interlaboratorio  
per l'assicurazione qualità  
dei risultati

Circuito **AQUA SI** diagnostica bovina e suina mediante  
tecniche sierologiche

**Schemi SI 1-21, SI 2a-21, SI 3-21, SI 4-21**

**Report Definitivo**

giugno 2022

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie**  
Struttura Complessa Territoriale 3 (SCT3)  
V.le dell'Università 10 – 35020 LEGNARO (PD)  
[www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it)

**CIRCUITO INTERLABORATORIO PER DIAGNOSTICA ELISA BOVINA E SUINA**  
**ANNO 2021**  
**REPORT DEFINITIVO**

**1. PIANIFICAZIONE DEL CIRCUITO**

Il circuito, organizzato dal laboratorio di Sierologia e Malattie Pianificate della Struttura Complessa Territoriale 3 (SCT3), ha fundamentalmente lo scopo di verificare la riproducibilità inter-laboratorio di prove diagnostiche, basate sulla metodica ELISA, eseguite in più laboratori sul medesimo pannello di campioni, e non quello di verificare sensibilità e specificità delle diverse reazioni diagnostiche utilizzate.

Di seguito sono elencate le prove oggetto del ring test con sigla identificativa, specie animale e tipologia di materiale inviato:

1. SI 1-2021: PRRS/ anticorpi (suino - siero di sangue)
2. SI 2a-2021: Febbre Q/ anticorpi (ovino, caprino e bovino - siero di sangue)
3. SI 3-2021: Virus respiratorio sinciziale bovino –RSBV/ anticorpi (bovino - siero di sangue)
4. SI 4-2021: *Neospora caninum*/ anticorpi (bovino - siero di sangue)

Per ogni prova sono stati inviati ai laboratori partecipanti 10 campioni, anonimi, di siero di sangue, numerati da 1 a 10. Per quanto concerne le prove ELISA, di norma, i diversi laboratori dell'IZSve hanno analizzato i campioni utilizzando lo stesso kit commerciale. Ovviamente, nel caso dei laboratori esterni, questi hanno utilizzato il kit in uso routinario presso di loro, non necessariamente identico a quello impiegato presso l'IZSve.

**2. CARATTERISTICHE, COMPOSIZIONE E CONTROLLO DEI CAMPIONI**

I campioni sono stati ottenuti dalla collezione predisposta allo scopo presso il laboratorio organizzatore (SCT3). Nell'allestire i pannelli distribuiti ai laboratori partecipanti, sono stati selezionati campioni per i quali fosse possibile definire un esito atteso *a priori*, basato su evidenze oggettive.

Si tratta in linea generale di campioni:

- considerabili positivi *a priori* perché
  - derivanti da animali infettati sperimentalmente
  - derivanti da animali con infezione persistente (ad es. vacche che hanno abortito feti positivi in PCR per *Neospora*)
  - derivati da animali provenienti da azienda in cui è stata accertata presenza dell'agente eziologico.
  - derivanti da animali con accertata presenza dell'agente eziologico (ad es. soggetti che hanno abortito, con feto o placenta positivi in PCR per febbre Q).
- considerabili negativi *a priori* perché
  - prelevati in aziende storicamente indenni rispetto alla malattia in esame.

- (in alternativa ai punti precedenti) definiti *a priori* positivi o negativi sulla base di prove diagnostiche che si basano su metodiche diverse rispetto a quelle oggetto del ring test; ad esempio:
  - Sieroneutralizzazione per RSBV anticorpi
  - Immunofluorescenza per *Neospora caninum* anticorpi
  - Fissazione del complemento per *Coxiella burnetii* anticorpi

Nella creazione del pannello di campioni inviato ai singoli laboratori, si è cercato di costruire una scala di reattività, in modo che fossero rappresentati per quanto possibile:

- campioni negativi
- campioni positivi
- campioni debolmente positivi / dubbi / borderline; ovviamente, per questa specifica categoria di campioni, che è quella più problematica in termini di stabilità di esito, ma che di regola rappresenta una quota alquanto minoritaria dei campioni che si riscontrano in campo in condizioni naturali, si è fatto in modo che per ogni pannello non fossero presenti in più di una/due unità.

I dettagli sono indicati nella composizione di ogni singolo pannello, riportata in calce alla tabella con i risultati del circuito.

I campioni sono stati tutti ricontrrollati prima della spedizione, quindi aliquotati, ritestati (3 aliquote di ciascun campione) per valutare l'omogeneità e spediti in condizione di congelamento, nel mese di dicembre 2021.

Ai laboratori destinatari è stato chiesto di conservare tutti i campioni a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino all'esecuzione dell'analisi. Per ciascun pannello si è proceduto ad una verifica di stabilità presso la SCT3, esaminando un'aliquota congelata dei campioni del pannello in data successiva a quella entro la quale era stato chiesto di eseguire le prove (nella fattispecie tale data era stata fissata al 31.01.2022).

I campioni qualitativi risultano stabili se concordi con il risultato atteso.

### **3. ELABORAZIONE STATISTICA DEI RISULTATI**

L'analisi dei campioni del circuito fornisce una risposta di tipo qualitativo; i risultati, espressi come esito (positivo/negativo/dubbio), sono stati analizzati tramite il calcolo dell'indice K di Cohen, secondo le modalità ed i limiti di accettabilità (nella fattispecie  $K > 0,60$ ) previsti dalla Istruzione di Dettaglio, interna all'IZS delle Venezie, - IDD IZS011 "Criteri per la definizione dei requisiti di base e per l'elaborazione dei dati per tecniche di prova immunologiche qualitative", misurando in tal modo la riproducibilità inter-laboratorio relativa a ciascuna prova considerata.

Il Kappa di Cohen è una misura dell'accordo (coefficient of agreement) tra le risposte qualitative o categoriali fornite dai 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 ne misura la significatività rispetto a  $K=0$ , indicando se l'accordo osservato è reale o semplicemente dovuto al caso.

A scopo interpretativo, abbiamo utilizzato la scala di Landis & Koch così strutturata:

K	Riproducibilità
$\leq 0$	<b>Scarsissima</b>
<b>0.01-0.20</b>	<b>Scarsa</b>
<b>0.21-0.40</b>	<b>Discreta</b>
<b>0.41-0.60</b>	<b>Moderata</b>
<b>0.61-0.80</b>	<b>Buona</b>
<b>0.81-1.00</b>	<b>Ottima</b>

#### 4. RISULTATI

I risultati di ogni schema del circuito sono riportati nelle tabelle allegate alla presente relazione nelle quali è specificato:

- il laboratorio esecutore, identificato da un codice alfanumerico attribuito automaticamente, per via informatica, al momento dell'iscrizione allo schema.
- il valore di reazione grezzo (densità ottica - OD) misurato per ciascuno dei 10 campioni sottoposti ad analisi e di quello medio ottenuto nei controlli positivo e negativo del Kit ELISA utilizzato.
- il valore di reazione normalizzato rispetto ai controlli secondo quanto indicato dalle istruzioni del kit, oppure rispetto al controllo positivo. Nel caso delle prove ELISA competitive, per ragioni di uniformità di lettura si è deciso di esprimere come valore normalizzato il valore di inibizione (%). Nel caso di kit che esprimono il risultato come valore S/N (ad es. NEOSPORA antibody IDVET competition), tale valore è stato quindi trasformato in percentuale di inibizione: a titolo di esempio, il valore S/N 0,80 equivale ad una percentuale di inibizione del 20%. Si precisa infine che, nel caso invece di kit competitivi, quando il campione esibisce una OD superiore al controllo negativo, la percentuale di inibizione viene arbitrariamente espressa come uguale a zero.
- l'esito ottenuto per ciascuno dei 10 campioni sottoposti ad analisi indicato con P (positivo), N (negativo), D (dubbio).

In calce ad ogni tabella sono riportati:

I valori attesi, espressi come esito e non come intensità di reazione. Si precisa inoltre che in alcuni casi gli esiti attesi hanno valore indicativo, trattandosi in effetti di campioni testati a priori, ma talvolta non provenienti da animali la cui condizione di vera positività/negatività è perfettamente nota, come può essere invece in caso di infezioni sperimentali o naturali comprovate. Si ribadisce il concetto che lo scopo di questo ring test è fondamentalmente quello di valutare la riproducibilità inter-laboratorio, e non quello di verificare sensibilità e specificità delle diverse prove diagnostiche utilizzate. Nel caso del campione numero 4 dello schema SI 1-2021 (ELISA PRRS anticorpi), campione di scrofetta ottenuto 10 gg p.i, quindi in fase iniziale di sierconversione, è stato assegnato un valore di esito atteso multiplo (N/P), come nel corso dei circuiti AQUA degli anni precedenti, essendo oggettivamente difficile attribuire un'unica categoria di esito a detto campione.

- La concordanza fra tutti i laboratori partecipanti, espressa dall'indice K di Cohen, nonché il suo livello di significatività statistica; tale concordanza **NON** include gli esiti attesi. La scelta del test K è stata fatta sulla base della considerazione che le prove prese in esame hanno in primis una valenza qualitativa, e quindi la circostanza di errore che più interessa è quella nella quale l'esito riferito ad un campione fluttua nei diversi laboratori da positivo a negativo.
- La descrizione di ciascun campione.

Nell'edizione 2021 di questo circuito, tutti gli schemi hanno evidenziato una concordanza classificabile come ottima (K compresa fra 0,81-1.00), indicando un ottimo livello di riproducibilità inter-laboratorio sempre altamente significativo (p-value=0,0000) rispetto all'ipotesi  $K=0$ .

## **5. RISULTATI, COMMENTI e/o RACCOMANDAZIONI relative ad OGNI SINGOLO SCHEMA del CIRCUITO**

### **5.1. Schema SI 1-21 Identificazione PRRS anticorpi**

La concordanza fra gli esiti è risultata ottima ( $K = 1$ ); questo risultato può essere imputato anche al fatto che il kit utilizzato è lo stesso in tutti i laboratori partecipanti. Il campione border/line (n.4) è stato identificato da tutti i partecipanti come positivo, evidenziando una buona sensibilità della metodica utilizzata.

### **5.2. Schema SI 2a-21 Identificazione Febbre Q anticorpi**

Per questo schema la concordanza fra gli esiti non è risultata perfetta, con un valore K, seppur compreso nel range definito come "ottimo" secondo la scala di Landis & Koch, pari a 0,8980. Sono stati impiegati kit provenienti da 2 fornitori diversi (Idexx ed IdVet). Due laboratori, entrambi utilizzatori del kit Idexx, non hanno correttamente identificato il campione 9 costituito da un pool di sieri bovini provenienti da Centro Genetico storicamente negativo.

### **5.3. Schema SI 3-21 Identificazione RSBV anticorpi**

La concordanza fra gli esiti è ottima ( $K = 1$ ), pur essendo stati impiegati kit provenienti da 3 fornitori diversi. Il campione border/line (n.6) è stato identificato da tutti i partecipanti come positivo, evidenziando una buona sensibilità del kit utilizzato.

### **5.4. Schema SI 4-21 Identificazione Neospora caninum anticorpi**

Come negli anni passati, nell'allestimento del pannello, i campioni positivi sono stati selezionati secondo il migliore criterio disponibile per definire in modo oggettivo un campione "positivo a priori", ovvero partendo da vacche che avevano abortito feti risultati positivi all'analisi PCR; per quelli negativi si è optato per campioni raccolti all'interno di aziende storicamente e ripetutamente negative alla prova ELISA in tutti i capi controllati. L'utilizzo in parallelo del test di immunofluorescenza solo parzialmente può essere considerato adeguato nel definire la positività o negatività del campione visto che, in linea generale, la sua sensibilità è inferiore a quella della metodica ELISA. Ugualmente agli altri pannelli, anche in questo sono stati inseriti sieri positivi diluiti con sieri negativi, in modo da ottenere campioni con reattività ridotta.

Anche per questo schema la concordanza è risultata ottima ( $K = 1$ ), grazie in parte al fatto che 6 laboratori su 7 hanno utilizzato lo stesso kit ELISA. I campioni border/line (nn. 4 e 5) sono stati identificati da tutti i laboratori partecipanti come positivi, evidenziando una buona sensibilità del kit utilizzato.

## 6. NOTE

- I laboratori sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric (Informativa ex art. 13 del D.Lgs. n. 206/30.6.2003 e s.m. e i. “Codice in materia di protezione dei dati personali”);
- i dati acquisiti sono utilizzati dall’Istituto per il Circuito Interlaboratorio AQUA e la gestione delle attività correlate;
- le attività comportanti il trattamento dei dati conferiti sono svolte per conseguire finalità a carattere istituzionale;
- il trattamento dei dati è effettuato sia con strumenti informatici che cartacei da parte dei servizi dell’Istituto;
- il titolare del trattamento è l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie in persona del Direttore Generale con sede in Legnaro (PD) – Viale dell’Università, 10 e il Responsabile f.f. della Struttura Complessa SCT3 è la dott.ssa Alda Natale;
- l’interessato potrà esercitare i diritti di cui all’art. 7 del D.Lgs. n. 206/2003 rivolgendosi all’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie con sede in Legnaro (PD) – Viale dell’Università, 10);
- tutti gli operatori dell’Organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA SI sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.



**F.to il Responsabile del circuito interlaboratorio**

**Dr. Lucia Selli**

Legnaro 29.06.2020  
Responsabile Circuito interlaboratorio AQUA SI  
Dr.ssa Lucia selli                      Fax 049 8084351  
e-mail [lselli@izsvenezie.it](mailto:lselli@izsvenezie.it)

Tel. 049 8084354

Responsabile statistico  
Dr.ssa Marzia Mancin                      Fax 049 8830268  
e-mail [mmancin@izsvenezie.it](mailto:mmancin@izsvenezie.it)

Tel. 049 8084431

## INFORMATIVA SULLA PRIVACY

**Ai sensi degli artt. 13 e 14 Reg UE 2016/679 si rende la presente informativa privacy.**

Titolare del trattamento: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE (in sigla IZSVE), con sede legale in 35020 LEGNARO (PD), Viale dell'Università 10, C.F. e P.IVA 00206200289, in persona del Direttore generale e legale rappresentante pro tempore tel 049/8084242, email [dirgen@izsvenezie.it](mailto:dirgen@izsvenezie.it) Dati del Responsabile della protezione dei dati (RPD/DPO): Avv. Piergiovanni Cervato, [dpo@izsvenezie.it](mailto:dpo@izsvenezie.it). Tipologia di dati e fonti: dati comuni, anagrafici e identificativi. Provengono tutti dall'Interessato. Finalità e modalità: i dati saranno trattati per l'adempimento di obblighi legali connessi all'iscrizione / adesione al circuito Aqua; il trattamento avverrà in modo sia manuale/cartaceo, che elettronico. Base giuridica: il trattamento si fonda, oltre che sul consenso manifestato tramite conferimento volontario dei dati, sull'adempimento di un obbligo contrattuale nonché sul legittimo interesse del Titolare. Obbligatorietà: il conferimento dei dati è obbligatorio e la sua mancanza comporta l'impossibilità per il Titolare di eseguire la prestazione richiesta e di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua. Destinatari: i dati potranno essere comunicati a soggetti all'uopo Incaricati dal Titolare, a Responsabili del trattamento e consulenti del Titolare. Conservazione: i dati saranno conservati fino a revoca del consenso. Diritti: l'Interessato può esercitare i suoi diritti di accesso, rettifica, cancellazione, limitazione, portabilità, opposizione via email ai dati del Titolare di cui sopra. Reclamo: l'Interessato può proporre reclamo al Garante per la protezione dei dati personali. Revoca: il consenso può essere revocato, ma ciò potrebbe comportare l'impossibilità di evadere la richiesta di iscrizione al circuito AQUA.

**CIRCUITO AQUA SI 2021 – Identificazione anticorpi verso PRRS virus nel siero di sangue suino mediante ELISA**

SCHEMA AQUA SI 1-21			DATI GREZZI / DATI ELABORATI										ESITO												
N.LAB	fornitore	formato	n. lotto	CAMPIONI										CAMPIONI											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NEG	POS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L000348	IDEXX	MONO	AB041	OD	1553	140	86	609	1068	164	1770	1228	138	1094	68	718	P	N	N	P	P	N	P	N	P
				S/P	2,28	0,11	0,03	0,83	1,54	0,15	2,62	1,78	0,11	1,58	///	///									
L000411	IDEXX	MONO	AB001	OD	1077	93	81	435	869	106	1498	915	97	595	74	547	P	N	N	P	P	N	P	N	P
				S/P	2,12	0,04	0,01	0,76	1,68	0,07	3,01	1,78	0,05	1,1	///	///									
L000420	IDEXX	MONO	AA961	OD	1271	107	60	426	802	113	1419	905	95	791	56	531	P	N	N	P	P	N	P	N	P
				S/P	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	///	///									
L000438	IDEXX	MONO	AB211	OD	1060	56	51	652	953	87	1100	1057	55	951	54	558	P	N	N	P	P	N	P	N	P
				S/P	2	0	0,01	1,19	1,78	0,06	2,07	1,99	0	1,78	///	///									
L000452	IDEXX	MONO	N.R.	OD	1271	112	77	605	949	125	1332	1020	108	856	65	525	P	N	N	P	P	N	P	N	P
				S/P	2,55	0,1	0,02	1,14	1,87	0,13	2,68	2,02	0,09	1,67	///	///									
L000549	IDEXX	MONO	AA741	OD	1187	100	64	508	773	94	1365	927	91	809	51	490	P	N	N	P	P	N	P	N	P
				S/P	2,59	0,11	0,03	1,04	1,65	0,1	2,99	1,99	0,09	1,73	///	///									
CONCORDANZA																ESITO ATTESO									
K= 1,00 (p-value = 0,0000)																P N N N/P P N P N P									

1- Pool di sieri di scrofa da azienda con focolato	2 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	3 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	4 - Pool sieri di scrofetta 10 gg. post infezione sperimentale (in sieroconversione)	5 - Pool di sieri di scrofetta 35 gg. post infezione sperimentale
6 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	7 - Pool di sieri di scrofa da azienda con focolato	8 - Pool sieri di scrofetta 21 gg. post infezione sperimentale	9 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	10 - Pool sieri di scrofetta 76 gg. post infezione sperimentale



**CIRCUITO AQUA SI 2021 – Identificazione anticorpi verso *Coxiella burnetii* nel siero di ruminanti mediante ELISA**

SCHEMA AQUA SI 2a-21			DATI GREZZI / DATI ELABORATI										ESITO																														
N.LAB	fornitore	formato	n. lotto	CAMPIONI										CONTROLLI		CAMPIONI																											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NEG	POS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																		
L000392	IDVET	MONO	J08	OD	1813	1710	106	168	118	1917	1592	1844	233	1489	53	1303	P	P	N	N	N	P	P	P	N	P																	
				S/P	1,42	1,34	0,04	0,09	0,05	1,5	1,24	1,44	0,15	1,16	///	///	///	///																									
L000399	IDVET	MONO	H37	OD	1931	1825	79	134	79	1981	1591	1845	149	1568	55	1164	P	P	N	N	N	P	P	P	N	P																	
				S/P	1,66	1,57	0,07	0,11	0,07	1,7	1,37	1,58	0,13	1,35	///	///	///	///																									
L000443	IDEXX	MONO	AB941	OD	3517	3366	457	481	216	3393	2072	3331	700	1126	96	1395	P	P	N	N	N	P	P	P	P	P																	
				S/P	2,63	2,52	0,28	0,3	0,09	2,54	1,52	2,49	0,46	0,79	///	///	///	///																									
L000509	IDEXX	MONO	AB701	OD	2885	2725	189	450	248	2867	1625	2704	520	698	89	1547	P	P	N	N	N	P	P	P	N	P																	
				S/P	1,92	1,81	0,07	0,25	0,11	1,91	1,05	1,79	0,26	0,42	///	///	///	///																									
L000510	IDVET	MONO	H 37	OD	1648	1413	73	100	99	1548	1130	1298	131	1078	50	826	P	P	N	N	N	P	P	P	N	P																	
				S/P	2,06	1,75	0,03	0,06	0,06	1,93	1,39	1,61	0,1	1,32	///	///	///	///																									
L000579	IDEXX	MONO	S671	OD	3150	2980	231	480	463	1820	2272	3050	1650	1548	90	1968	P	P	N	N	N	P	P	P	P	P																	
				S/P	1,63	1,54	0,07	0,21	0,2	0,92	1,16	1,58	0,83	0,78	///	///	///	///																									
L000791	IDVET	MONO	H37	OD	3000	2705	97	180	83	3000	2002	2595	142	1493	54	928	P	P	N	N	N	P	P	P	N	P																	
				S/P	3,37	3,03	0,05	0,14	0,03	3,37	2,23	2,91	0,1	1,65	///	///	///	///																									
				CONCORDANZA <b>K= 0.8980</b> (p-value = 0,0000)										ESITO ATTESO																													
1 – Siero vacca con aborto (piacentina PCR positiva)				2 – Siero vacca con aborto (feto PCR positivo)										3 – Pool sieri ovini da azienda storicamente negativa										4 – Pool sieri bovini storicamente negativi (centro genetico)										5 – Pool sieri ovini da azienda storicamente negativa									
6 – Pool sieri bovini da azienda con focolaio (tampone al parto PCR positivo)				7 – Pool sieri caprini da azienda con focolaio										8 – Siero vacca con aborto (feto PCR positivo)										9 – Pool sieri bovini storicamente negativi (centro genetico)										10 – Siero di capra da azienda con focolaio (latte PCR positivo)									



