



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

Schemi SI 1-23, SI 2a-23, SI 3-23, SI 4-23

Report Definitivo

Agosto 2024

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

CIRCUITO INTERLABORATORIO PER DIAGNOSTICA ELISA BOVINA E SUINA
ANNO 2023
REPORT DEFINITIVO

1. PIANIFICAZIONE DEL CIRCUITO

Il circuito, organizzato dal laboratorio di Sierologia e Malattie Pianificate della Struttura Complessa Territoriale 3 (SCT3), ha lo scopo di verificare la riproducibilità interlaboratorio 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 1-2023: PRRS/ anticorpi (suino - siero di sangue)
2. SI 2a-2023: Febbre Q/ anticorpi (ovino, caprino e bovino - siero di sangue)
3. SI 3-2023: Virus respiratorio sinciziale bovino –RSBV/ anticorpi (bovino - siero di sangue)
4. SI 4-2023: *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*)
 - derivanti 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 ricontrollati 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 2023.

Ai laboratori destinatari è stato chiesto di conservare tutti i campioni a -20°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 31.01.2024).

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 IZS 011 "Criteri per la validazione e verifica delle prove sierologiche", 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
≤ 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

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.

- 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 2023 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 ($p\text{-value}=0,0000$) rispetto all'ipotesi $K=0$. Due circuiti, SI 1-23 e SI 3-23, hanno visto la partecipazione di soli tre laboratori, aspetto che non ha però compromesso l'analisi dei risultati avendo questi ottenuto la perfetta concordanza.

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

5.1. Schema SI 1-23 Identificazione PRRS anticorpi

La concordanza fra gli esiti è risultata ottima ($K = 1,00$). Tutti i laboratori hanno correttamente identificato i campioni, compreso il campione 2 diluito 1:10 per simulare una debole reattività, anche con l'utilizzo di kit forniti da due diversi produttori (Idexx e Ingenasa).

5.2. Schema SI 2a-23 Identificazione Febbre Q anticorpi

La concordanza fra gli esiti è risultata ottima ($K = 0,94$), con un unico campione classificato non correttamente da un laboratorio. Il campione 10 infatti, avente esito atteso negativo, è stato classificato da un laboratorio come dubbio. Per l'esecuzione delle prove i laboratori partecipanti hanno impiegato kit provenienti da 2 fornitori diversi (Idexx ed IdVet).

5.3. Schema SI 3-23 Identificazione RSBV anticorpi

La concordanza fra gli esiti è risultata ottima ($K = 1,00$), con l'impiego di kit provenienti da 2 fornitori diversi (IZSLER, Ingenasa).

5.4. Schema SI 4-23 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. Nella predisposizione del pannello sono stati inoltre inseriti sieri positivi diluiti con sieri negativi, in modo da ottenere campioni con reattività ridotta.

Anche per questo schema la concordanza è risultata ottima ($K = 1,00$). I campioni border/line (7 e 10) sono stati identificati da tutti i laboratori partecipanti come positivi, evidenziando una buona sensibilità dei due kit utilizzati (Idexx ed IdVet).

6. NOTE

- I laboratori sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numerici (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 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. Laura Lucchese



Legnaro 28.08.2024

Responsabile Circuito interlaboratorio AQUA SI

Dr.ssa Laura Lucchese

Fax 049 8084351

Tel. 049 8084358

e-mail llucchese@izsvenezie.it

Responsabile statistico

Dr.ssa Marzia Mancin

Fax 049 8830268

Tel. 049 8084431

e-mail mmancin@izsvenezie.it

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 Dati del Responsabile della protezione dei dati (RPD/DPO): Avv. Piergiovanni Cervato, 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 2023 – Identificazione anticorpi verso PRRS virus nel siero di sangue suino mediante ELISA

SCHEMA AQUA SI 1-23				DATI GREZZI / DATI ELABORATI														ESITO									
				CAMPIONI											CONTROLLI			CAMPIONI									
N.LAB	fornitore	formato	n. lotto		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	AE471	OD	911	439	602	57	740	51	1058	67	1174	48	52	467	P	P	P	N	P	N	P	N	P	N	
				S/P	2,07	0,93	1,32	0,01	1,66	0	2,42	0,04	2,47	0	///	///											
L000420	Ingenasa	MONO	220027	OD	3921	2875	3799	110	2872	125	3902	200	3977	127	162	933	P	P	P	N	P	N	P	N	P	N	
				S/P	4,87	3,51	4,71	0	3,51	0	4,85	0,04	4,94	0	///	///											
L000452	IDEXX	MONO	AE471	OD	999	505	727	73	822	68	1064	94	1160	67	63	481	P	P	P	N	P	N	P	N	P	N	
				S/P	2,24	1,06	1,59	0,02	1,82	0,01	2,39	0,07	2,62	0,01	///	///											
				CONCORDANZA K= 1,00 (p-value = 0,0000)										ESITO ATTESO				P	P	P	N	P	N	P	N	P	N

1- Pool di sieri di scrofa da azienda con focolaio	2 - Siero positivo da focolaio diluito 1:10	3 - Pool di sieri di scrofa da azienda con focolaio	4 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	5 - Pool di sieri di scrofa da azienda con focolaio
6 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	7 - Pool di sieri di scrofa da azienda con focolaio	8 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa	9 - Pool di sieri di scrofa da azienda con focolaio	10 - Pool di sieri di scrofa da azienda storicamente negativa

CIRCUITO AQUA SI 2023 – Identificazione anticorpi verso *Coxiella burnetii* nel siero di sangue di ruminanti mediante ELISA

SCHEMA AQUA SI 2a-23				DATI GREZZI / DATI ELABORATI														ESITO									
				CAMPIONI												CONTROLLI		CAMPIONI									
N.LAB	fornitore	formato	n. lotto		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	K69	OD	1105	1162	150	867	61	88	1238	1116	91	205	35	980	P	P	N	P	N	N	P	P	N	N	
				S/P	1,13	1,19	0,12	0,87	0,04	0,06	1,27	1,14	0,06	0,18	///	///											
L000399	IDVET	MONO	K69	OD	2228	2311	323	1651	124	156	2125	2141	116	377	54	1194	P	P	N	P	N	N	P	P	N	N	
				S/P	1,86	1,93	0,27	1,38	0,10	0,13	1,78	1,79	0,10	0,32	///	///											
L000443	IDEXX	MONO	AF291	OD	1350	1963	84	42	54	68	3072	2957	284	323	43	1384	P	P	N	P	N	N	P	P	N	N	
				S/P	0,97	1,43	0,03	0,42	0,04	0,02	2,26	2,17	0,18	0,21	///	///											
L000509	IDVET	MONO	K69	OD	2012	2061	357	1634	108	208	2113	2087	135	383	58	1272	P	P	N	P	N	N	P	P	N	N	
				S/P	1,61	1,65	0,25	1,30	0,04	0,12	1,69	1,67	0,06	0,27	///	///											
L000510	IDVET	MONO	K69	OD	2437	2373	456	2027	137	258	2521	2663	162	581	50	1729	P	P	N	P	N	N	P	P	N	N	
				S/P	1,42	1,38	0,24	1,18	0,05	0,12	1,47	1,56	0,07	0,32	///	///											
L000579	IDEXX	MONO	AD211	OD	1519	1878	114	676	132	94	2733	2801	256	293	83	1368	P	P	N	P	N	N	P	P	N	N	
				S/P	1,12	1,40	0,02	0,46	0,03	0,01	2,06	2,12	0,13	0,16	///	///											
L000791	ID VET	MONO	K69	OD	1872	1850	312	1363	104	198	1996	2030	180	457	42	1034	P	P	N	P	N	N	P	P	N	D	
				S/P	1,85	1,82	0,27	1,33	0,06	0,16	1,97	2,00	0,14	0,42	///	///											
				CONCORDANZA K= 0,94 (p-value = 0,0000)										ESITO ATTESO				P	P	N	P	N	N	P	P	N	N
1 – Siero capra da azienda focolaio			2 – Siero capra da azienda focolaio				3 - Pool sieri caprini da azienda storicamente negativa					4 – Siero capra da azienda focolaio (latte PCR positivo)					5 – Pool sieri ovini da azienda storicamente negativa										
6 – Pool sieri ovini da azienda storicamente negativa			7 – Siero vacca con aborto (placenta PCR positiva)				8 – Siero vacca con aborto (placenta PCR positiva)					9 – Pool di sieri bovini storicamente negativi (centro tori)					10 – Pool di sieri bovini storicamente negativi (centro tori)										

CIRCUITO AQUA SI 2023 – Identificazione anticorpi verso RSB virus nel siero di sangue bovino mediante ELISA

SCHEMA AQUA SI 3-23				DATI GREZZI / DATI ELABORATI														ESITO									
				CAMPIONI												CONTROLLI		CAMPIONI									
N.LAB	fornitore	formato	n. lotto		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NEG	POS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
L000509	IZSLER	BI	Ag 1/2023	OD	252	633	897	889	0	1072	0	327	0	0	0	1297	P	P	P	P	N	P	N	P	N	N	
				S/P	0,19	0,49	0,69	0,69	0	0,83	0	0,25	0	0	///	///											
L000549	INGEZIM	MONO	230072	OD	320	59	46	43	674	48	741	69	956	742	910	89	P	P	P	P	N	P	N	P	N	N	
					/	/	/	/	/	/	/	/	/	///	///												
L000647	INGEZIM	MONO	230087	OD	516	110	84	61	1081	87	1249	116	1249	1055	1128	76	P	P	P	P	N	P	N	P	N	N	
					/	/	/	/	/	/	/	/	/	///	///												
				CONCORDANZA K= 1,00 (p-value = 0,0000)										ESITO ATTESO				P	P	P	P	N	P	N	P	N	N

1 - Siero individuale 57 giorni dopo infezione sperimentale	2 - Pool sieri da azienda positiva	3 - Siero individuale da azienda positiva	4 - Pool sieri da azienda positiva	5 - Pool sieri da azienda storicamente negativa
6 - Pool sieri da azienda positiva	7 - Pool sieri da azienda storicamente negativa	8 - Pool sieri da azienda positiva	9 - Pool sieri da azienda storicamente negativa	10 - Pool sieri da azienda storicamente negativa

CIRCUITO AQUA 2023 – Identificazione anticorpi verso *Neospora caninum* nel siero di sangue bovino mediante ELISA

SCHEMA AQUA SI 4-23				DATI GREZZI/DATI ELABORATI														ESITO									
				CAMPIONI												CONTROLLI		CAMPIONI									
N.LAB	fornitore	formato	n. lotto		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	L23	OD	80	201	1329	1490	121	85	121	1379	1285	203	1364	64	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				IB%	94	85	3	0	91	94	91	0	6	85	///	///											
L000443	IDVET	MONO	K98	OD	65	258	1054	1185	82	56	113	1111	1202	187	1069	84	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				IB%	94	76	1	0	92	95	89	0	0	83	///	///											
L000509	IDVET	MONO	L23	OD	74	210	1091	1135	87	79	110	1032	1062	265	1016	78	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				IB%	93	79	0	0	91	92	89	0	0	74	///	///											
L000510	IDVET	MONO	L23	OD	128	543	2112	1948	167	103	286	2611	2335	595	1934	102	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				IB%	93	72	0	0	91	95	85	0	0	69	///	///											
L000579	IDEXX	MONO	GW819	OD	1205	1210	157	175	1408	1446	899	296	164	549	100	918	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				S/P	1,35	1,35	0,07	0,09	1,60	1,65	0,98	0,24	0,08	0,55	///	///											
L000645	IDVET	MONO	L23	OD	143	455	2016	2215	147	136	211	2356	2107	367	2056	109	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				IB%	93	77	0	0	92	93	89	0	0	81	///	///											
L000791	IDVET	MONO	L23	OD	69	217	1008	1179	70	56	77	1259	1195	152	1046	59	P	P	N	N	P	P	P	N	N	P	
				IB%	93	79	4	0	93	94	92	0	0	85	///	///											
				CONCORDANZA K= 1,00 (p-value = 0,0000)										ESITO ATTESO				P	P	N	N	P	P	P	N	N	P
1 - Siero di vacca con aborto positivo PCR			2 - Siero di vacca con aborto positivo PCR					3 - Pool sieri da azienda storicamente negativa (Elisa e IFAT)					4 - Pool sieri da azienda storicamente negativa (Elisa e IFAT)					5 - Siero di vacca con aborto positivo PCR									
6 - Siero di vacca con aborto positivo PCR			7 - Siero di vacca con aborto positivo PCR (campione n.6) diluito 1:16 con siero da az. storicamente negativa					8 - Pool sieri da azienda storicamente negativa (Elisa e IFAT)					9 - Pool sieri da azienda storicamente negativa (Elisa e IFAT)					10 - Siero di vacca con aborto positivo PCR (campione n.6) diluito1:32 con siero da az. storicamente negativa									