



IZSAM G.CAPORALE
TERAMO



CESME

Centro di Referenza Nazionale

CIRCUITO INTER-LABORATORIO

RT-PCR BLUETONGUE

Distribuzione 1/2012

Ottavio Portanti.

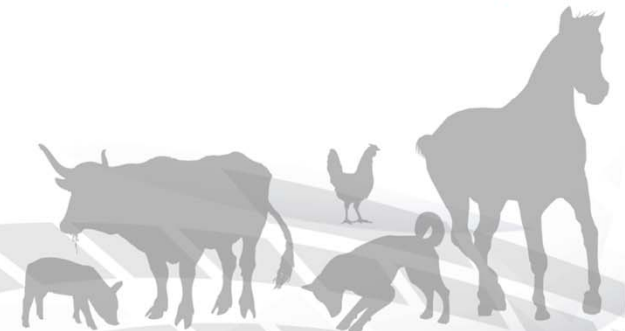
«Giornata di studio sulla Bluetongue», IZS A&M «G. Caporale» Teramo. 3 ottobre 2013.



Circuito inter-laboratorio RT-PCR Bluetongue: distribuzione 1/2012



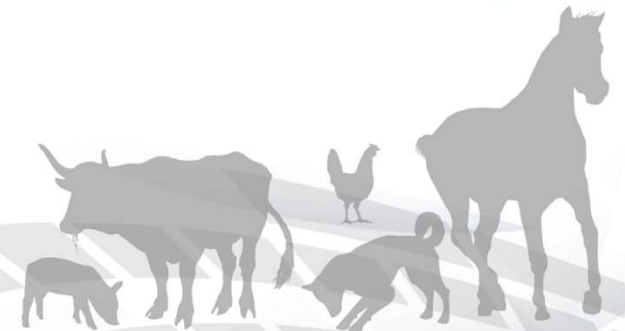
- Sesto circuito inter-laboratorio per la diagnosi virologica della Bluetongue, partecipanti 14 laboratori
- Ogni laboratorio ha ricevuto 20 campioni di sangue
- Ogni campione è stato analizzato con metodo quantitativo e/o qualitativo
- I campioni di sangue da esaminare sono stati inviati nel mese di dicembre 2012



Circuito inter-laboratorio RT-PCR Bluetongue: distribuzione 1/2012

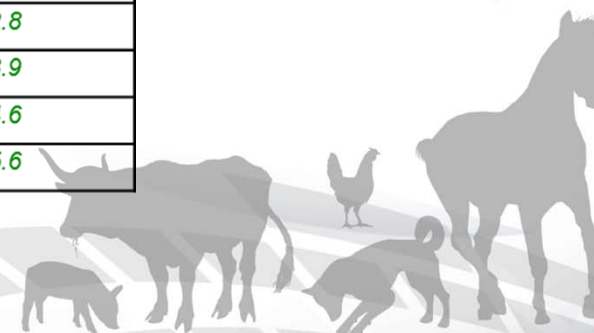


- I campioni impiegati per il circuito sono stati preparati utilizzando sangue in EDTA prelevato da animali non infetti
- I campioni sono stati infettati in laboratorio con ceppi del virus della Bluetongue (BTV) e del virus della malattia emorragica epizootica del cervo (EHDV) previamente titolati ed inattivati
- Ad ogni laboratorio partecipante è stato associato un codice numerico così come ad ogni campione inviato è stato attribuito un identificativo numerico



Ceppi BTV ed EHDV utilizzati per infettare i campioni di sangue

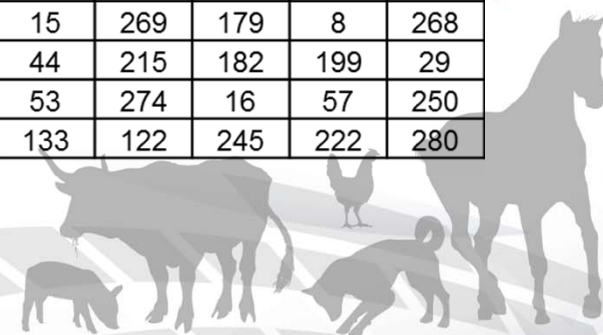
N° campione	Ceppo	Titolo (TCID ₅₀ /ml)
1	BTV 1	10 ^{3.9}
2	BTV 2	10 ^{4.1}
3	BTV 4	10 ^{5.0}
4	BTV 5	10 ^{5.1}
5	BTV 8	10 ^{3.5}
6	BTV 8	10 ^{4.5}
7	BTV 9	10 ^{6.1}
8	BTV 9	10 ^{5.1}
9	BTV 9	10 ^{4.1}
10	BTV 9	10 ^{3.1}
11	BTV 16	10 ^{4.1}
12	BTV 16	10 ^{3.1}
13	BTV 24	10 ^{2.8}
14	BTV 26	10 ^{3.9}
15	EHDV 6	10 ^{4.6}
16	EHDV 7	10 ^{5.6}



Decodifica campioni



N° campione	Identificativo Laboratorio													
	358	361	362	365	367	368	369	377	378	380	390	594	619	681
1	261	270	60	193	186	84	157	229	67	24	34	123	21	114
2	46	165	278	70	225	88	249	86	160	1	73	171	207	155
3	210	129	247	13	77	39	252	212	31	27	203	117	148	258
4	159	18	135	22	43	20	142	256	202	228	237	211	163	158
5	3	156	113	243	85	239	37	232	72	227	248	194	83	170
6	267	49	259	169	121	168	238	33	140	100	191	9	131	36
7	134	2	241	107	146	105	137	226	56	92	217	279	221	262
8	42	78	201	95	141	136	99	149	106	91	120	94	263	167
9	55	214	150	11	64	200	14	80	197	205	224	218	65	128
10	234	209	264	181	162	164	93	255	116	240	112	10	41	62
11	174	58	246	230	102	110	265	87	32	236	68	153	144	127
12	115	108	223	101	38	188	257	52	51	126	138	5	213	40
13	103	81	19	143	132	271	190	6	178	195	30	273	235	54
14	145	23	251	204	124	277	242	219	119	198	176	275	175	90
15	47	161	28	109	104	254	59	118	125	216	96	173	253	35
16	97	196	177	276	183	152	206	231	208	111	74	139	12	48
17	61	130	151	187	185	260	50	266	4	15	269	179	8	268
18	79	189	63	17	7	233	180	184	272	44	215	182	199	29
19	75	220	192	25	172	89	154	26	66	53	274	16	57	250
20	45	82	76	166	98	69	244	71	147	133	122	245	222	280





 **CESME**
Centro di Referenza Nazionale

Omogeneità e stabilità dei campioni

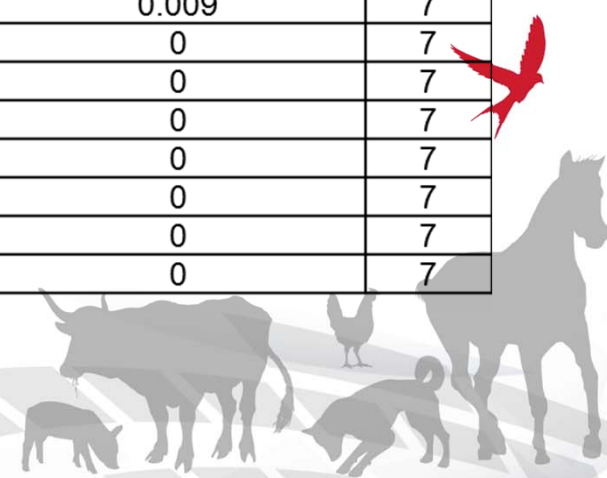


- L'omogeneità è stata valutata testando 8 ripetizioni per ogni livello di positività
- La stabilità è stata valutata esaminando 3 aliquote di ciascun campione sottoposte a stress termico (temperatura ambiente) ed esaminate a diversi intervalli di tempo (t_0 , t_1 (24h), t_2 (48h) t_3 (72h))



Analisi per la valutazione dell'omogeneità

N° campione	media	dev.st.	mln.	max.	CV	T2	Variazione tra i campioni	g.d.l.
1	29.19	0.38	28.55	29.58	1.3	0.04	0.005	7
2	28.70	0.82	27.19	29.76	2.9	0.16	0.023	7
3	24.00	0.31	23.61	24.45	1.3	0.03	0.004	7
4	24.54	0.50	23.64	25.25	2.0	0.18	0.025	7
5	31.25	0.69	29.88	32.29	2.2	0.11	0.015	7
6	27.93	0.76	27.02	29.10	2.7	0.14	0.021	7
7	23.00	0.33	22.51	23.39	1.4	0.03	0.005	7
8	26.45	1.01	25.15	28.67	3.8	0.27	0.039	7
9	30.25	0.33	29.69	30.60	1.1	0.02	0.004	7
10	33.78	0.83	33.25	35.75	2.4	0.14	0.020	7
11	26.39	0.96	25.76	28.69	3.7	0.25	0.035	7
12	29.84	0.47	29.19	30.45	1.6	0.05	0.007	7
13	31.68	0.54	30.60	32.22	1.7	0.06	0.009	7
14	45	0	45	45	0	0	0	7
15	45	0	45	45	0	0	0	7
16	45	0	45	45	0	0	0	7
17	45	0	45	45	0	0	0	7
18	45	0	45	45	0	0	0	7
19	45	0	45	45	0	0	0	7
20	45	0	45	45	0	0	0	7

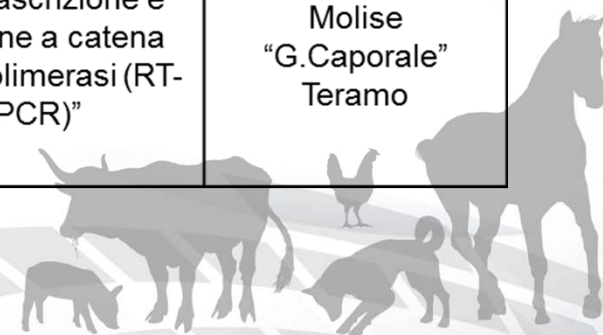


Analisi di regressione per la valutazione della stabilità

N° campione	Max	min	Range (Max-min)	Equazione retta regressione	Valore di t coefficiente angolare	Significatività
1	27.07	25.57	1.49	26,146 + 0,066*t	0,007	0,23580636
2	27.18	25.70	1.48	26,241 + 0,0003*t	0,000	0,947899549
3	23.42	21.91	1.51	22,220 + 0,008*t	0,008	0,102970186
4	25.22	22.60	2.61	23,849 + 0,002*t	0,002	0,842541822
5	30.16	28.3	1.86	29,570 - 0,0009*t	-0,001	0,888444808
6	27.80	25.82	1.98	26,382 + 0,014*t	0,014	0,06228897
7	22.24	20.57	1.67	20,954 + 0,014*t	0,014	0,001149061
8	25.17	24.00	1.17	24,505 + 0,005*t	0,005	0,22291695
9	28.69	27.55	1.14	28,203 - 0,003*t	-0,003	0,526781339
10	31.77	30.28	1.50	30,848 + 0,006*t	0,006	0,193033584
11	25.79	21.01	4.78	24,213 + 0,014*t	0,014	0,30921832
12	29.20	27.80	1.41	28,396 + 0,060*t	0,006	0,283826767
13	31.45	28.34	3.11	29,829 - 0,004*t	-0,004	0,694909763
14	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-
15	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-
16	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-
17	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-
18	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-
19	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-
20	45,00	45,00	0,00	45,000 + 0,000*t	0	-

Metodi impiegati dai laboratori

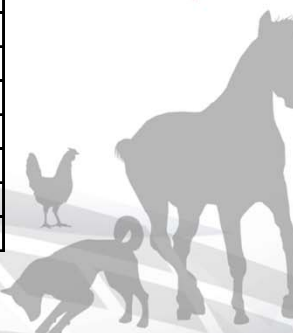
Nome prova	ID laboratorio	Metodo	Procedura	Ente/ditta emittente
Protocollo IZS	358, 361, 362, 365, 367, 368, 369, 377, 378, 380, 390, 594, 619, 681.	Real time RT-PCR	IZS TE B2.1.9 SOP016 "Identificazione mediante RT-PCR real-time "one-step" del virus della Bluetongue" Rev. 0	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale" Teramo
Protocollo PCR convenzionale	362, 368, 390.	RT-PCR	IZS TE B2.1.9 SOP005 " Ricerca del virus della Bluetongue mediante retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)"	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale" Teramo



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	One Step q-PCR system (invitrogen)
Kit estrazione	HPV
Strumento	7900 HT
Soglia Ct BTV	0,1
Soglia Ct IPC	0,1

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
358	261	1	24,3	26,5	-2,2	33.69	POSITIVO	POSITIVO
	46	2	25,7	26,8	-1,1	31.26	POSITIVO	POSITIVO
	210	3	21,9	22,5	-0,6	34.44	POSITIVO	POSITIVO
	159	4	23,0	23,6	-0,6	31.78	POSITIVO	POSITIVO
	3	5	29,0	28,2	0,8	30.13	POSITIVO	POSITIVO
	267	6	25,8	27,2	-1,5	32.92	POSITIVO	POSITIVO
	134	7	21,3	21,7	-0,4	33.86	POSITIVO	POSITIVO
	42	8	21,7	23,8	-2,1	31.15	POSITIVO	POSITIVO
	55	9	27,1	27,6	-0,5	30.76	POSITIVO	POSITIVO
	234	10	30,7	31,0	-0,3	31.48	POSITIVO	POSITIVO
	174	11	24,9	25,2	-0,3	32.33	POSITIVO	POSITIVO
	115	12	27,2	27,7	-0,5	31.79	POSITIVO	POSITIVO
	103	13	28,9	30,5	-1,6	30.25	POSITIVO	POSITIVO
	145	14	45,0	45,0		31.05	NEGATIVO	POSITIVO
	47	15	45,0	45,0		31.37	NEGATIVO	NEGATIVO
	97	16	45,0	45,0		30.49	NEGATIVO	NEGATIVO
	61	17	45,0	45,0		31.31	NEGATIVO	NEGATIVO
	79	18	45,0	45,0		30.97	NEGATIVO	NEGATIVO
	75	19	45,0	45,0		31.00	NEGATIVO	NEGATIVO
	45	20		37,4	45,0		30.26	POSITIVO



Risultati (test quantitativo)

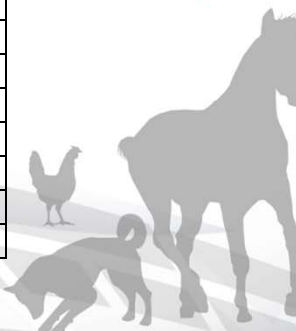
Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	ABIPRISM 7700
Soglia Ct BTV	38
Soglia Ct IPC	38

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
361	270	1	25,2	26,5	-1,3	36.44	POSITIVO	POSITIVO
	165	2	25,1	26,8	-1,7	34.33	POSITIVO	POSITIVO
	129	3	20,4	22,5	-2,2	34.74	POSITIVO	POSITIVO
	18	4	21,8	23,6	-1,8	38.22	POSITIVO	POSITIVO
	156	5	28,6	28,2	0,4	32.83	POSITIVO	POSITIVO
	49	6	25,4	27,2	-1,8	34.26	POSITIVO	POSITIVO
	2	7	19,6	21,7	-2,1	41.90	POSITIVO	POSITIVO
	78	8	23,1	23,8	-0,7	35.88	POSITIVO	POSITIVO
	214	9	26,3	27,6	-1,3	34.30	POSITIVO	POSITIVO
	209	10	30,2	31,0	-0,8	36.02	POSITIVO	POSITIVO
	58	11	24,8	25,2	-0,4	36.21	POSITIVO	POSITIVO
	108	12	27,8	27,7	0,1	33.60	POSITIVO	POSITIVO
	81	13	31,2	30,5	0,7	37.60	POSITIVO	POSITIVO
	23	14	29,9	45,0		32.06	POSITIVO	POSITIVO
	161	15	38,2	45,0		34.46	NEGATIVO	NEGATIVO
	196	16	38,7	45,0		35.03	NEGATIVO	NEGATIVO
	130	17	45	45,0		34.27	NEGATIVO	NEGATIVO
	189	18	43,7	45,0		33.18	NEGATIVO	NEGATIVO
	220	19	41,7	45,0		34.46	NEGATIVO	NEGATIVO
	82	20	45	45,0		34.75	NEGATIVO	NEGATIVO

Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	Jump Start SIGMA
Kit estrazione	Trizol
Strumento	CFX96 BioRad
Soglia Ct BTV	<38
Soglia Ct IPC	<36

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
362	60	1	26,4	26,5	-0,1	35.12	POSITIVO	POSITIVO
	278	2	25,5	26,8	-1,3	33.01	POSITIVO	POSITIVO
	247	3	22,4	22,5	-0,1	34.55	POSITIVO	POSITIVO
	135	4	23,3	23,6	-0,4	35.51	POSITIVO	POSITIVO
	113	5	30,3	28,2	2,1	33.52	POSITIVO	POSITIVO
	259	6	27,3	27,2	0,1	33.21	POSITIVO	POSITIVO
	241	7	22,3	21,7	0,6	34.66	POSITIVO	POSITIVO
	201	8	25,8	23,8	2,0	34.2	POSITIVO	POSITIVO
	150	9	27,5	27,6	-0,1	32.2	POSITIVO	POSITIVO
	264	10	32,0	31,0	1,0	32.98	POSITIVO	POSITIVO
	246	11	26,6	25,2	1,4	34.51	POSITIVO	POSITIVO
	223	12	30,5	27,7	2,8	33.21	POSITIVO	POSITIVO
	19	13	34,5	30,5	4,0	34.51	POSITIVO	POSITIVO
	251	14	45,0	45,0		33.92	NEGATIVO	POSITIVO
	28	15	45,0	45,0		33.32	NEGATIVO	NEGATIVO
	177	16	45,0	45,0		33.19	NEGATIVO	NEGATIVO
	151	17	45,0	45,0		33.12	NEGATIVO	NEGATIVO
	63	18	45,0	45,0		33.55	NEGATIVO	NEGATIVO
	192	19	45,0	45,0		32.88	NEGATIVO	NEGATIVO
	76	20	45,0	45,0		33.51	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	7500 HT
Soglia Ct BTV	38
Soglia Ct IPC	45

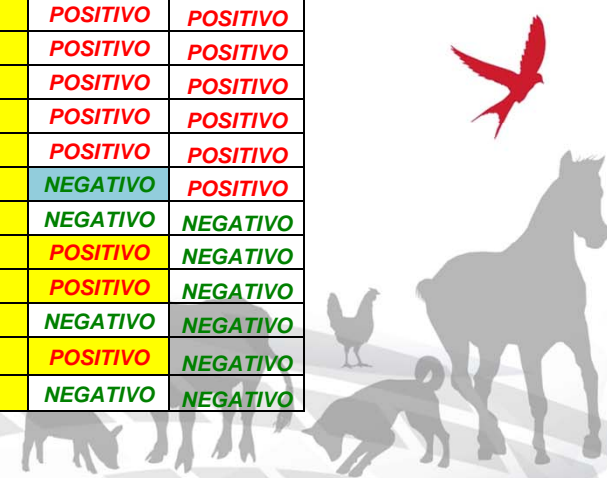
ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
365	193	1	27,8	26,5	1,3	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	70	2	27,2	26,8	0,4	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	13	3	23,1	22,5	0,6	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	22	4	25,2	23,6	1,6	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	243	5	31,0	28,2	2,8	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	169	6	27,4	27,2	0,2	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	107	7	21,9	21,7	0,2	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	95	8	25,8	23,8	2,0	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	11	9	29,2	27,6	1,6	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	181	10	31,8	31,0	0,8	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	230	11	24,3	25,2	-0,9	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	101	12	45,0	27,7	17,3	45.00	NEGATIVO	POSITIVO
	143	13	29,6	30,5	-0,9	45.00	POSITIVO	POSITIVO
	204	14	45,0	45,0		45.00	NEGATIVO	POSITIVO
	109	15	37,0	45,0		45.00	POSITIVO	NEGATIVO
	276	16	45,0	45,0		45.00	NEGATIVO	NEGATIVO
	187	17	45,0	45,0		45.00	NEGATIVO	NEGATIVO
	17	18	45,0	45,0		45.00	NEGATIVO	NEGATIVO
	25	19	35,5	45,0		45.00	POSITIVO	NEGATIVO
	166	20	45,0	45,0		45.00	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	QIAamp Viral RNA
Strumento	7500 Fast Real time PCR
Soglia Ct BTV	38
Soglia Ct IPC	27

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
367	186	1	24,0	26,5	-2,5	27	POSITIVO	POSITIVO
	225	2	24,0	26,8	-2,8	27	POSITIVO	POSITIVO
	77	3	19,0	22,5	-3,5	27	POSITIVO	POSITIVO
	43	4	21,0	23,6	-2,6	27	POSITIVO	POSITIVO
	85	5	28,0	28,2	-0,2	27	POSITIVO	POSITIVO
	121	6	24,0	27,2	-3,2	27	POSITIVO	POSITIVO
	146	7	18,0	21,7	-3,7	27	POSITIVO	POSITIVO
	141	8	22,0	23,8	-1,8	27	POSITIVO	POSITIVO
	64	9	25,0	27,6	-2,6	27	POSITIVO	POSITIVO
	162	10	29,0	31,0	-2,0	27	POSITIVO	POSITIVO
	102	11	24,0	25,2	-1,2	27	POSITIVO	POSITIVO
	38	12	27,0	27,7	-0,7	27	POSITIVO	POSITIVO
	132	13	30,0	30,5	-0,5	27	POSITIVO	POSITIVO
	124	14	40,0	45,0		27	NEGATIVO	POSITIVO
	104	15	39,0	45,0		27	NEGATIVO	NEGATIVO
	183	16	37,0	45,0		27	POSITIVO	NEGATIVO
	185	17	36,0	45,0		27	POSITIVO	NEGATIVO
	7	18	0,0	45,0		27	NEGATIVO	NEGATIVO
	172	19	37,0	45,0		27	POSITIVO	NEGATIVO
	98	20	0,0	45,0		27	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	Step one plus
Soglia Ct BTV	<38
Soglia Ct IPC	<36

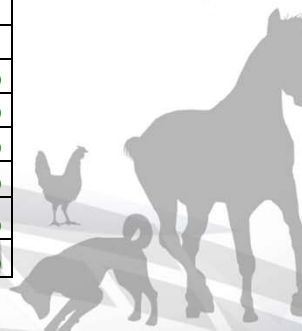
ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
368	84	1	29,3	26,5	2,8	31.89	POSITIVO	POSITIVO
	88	2	28,4	26,8	1,6	31.50	POSITIVO	POSITIVO
	39	3	24,4	22,5	1,9	33.79	POSITIVO	POSITIVO
	20	4	25,7	23,6	2,1	32.86	POSITIVO	POSITIVO
	239	5	25,4	28,2	-2,8	33.17	POSITIVO	POSITIVO
	168	6	29,8	27,2	2,6	31.39	POSITIVO	POSITIVO
	105	7	23,0	21,7	1,3	33.62	POSITIVO	POSITIVO
	136	8	24,1	23,8	0,3	32.29	POSITIVO	POSITIVO
	200	9	28,1	27,6	0,5	31.63	POSITIVO	POSITIVO
	164	10	31,3	31,0	0,3	30.88	POSITIVO	POSITIVO
	110	11	24,6	25,2	-0,6	34.60	POSITIVO	POSITIVO
	188	12	28,9	27,7	1,2	29.71	POSITIVO	POSITIVO
	271	13	30,2	30,5	-0,3	32.46	POSITIVO	POSITIVO
	277	14	44,5	45,0		28.92	NEGATIVO	POSITIVO
	254	15	45,0	45,0		30.38	NEGATIVO	NEGATIVO
	152	16	45,0	45,0		29.93	NEGATIVO	NEGATIVO
	260	17	45,0	45,0		29.33	NEGATIVO	NEGATIVO
	233	18	45,0	45,0		29.52	NEGATIVO	NEGATIVO
	89	19	45,0	45,0		30.88	NEGATIVO	NEGATIVO
	69	20	45,0	45,0		29.79	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	ABI prism 7000
Soglia Ct BTV	38
Soglia Ct IPC	32

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
369	157	1	27,4	26,5	0,9	31.11	POSITIVO	POSITIVO
	249	2	27,9	26,8	1,1	30.31	POSITIVO	POSITIVO
	252	3	23,9	22,5	1,4	33.70	POSITIVO	POSITIVO
	142	4	24,3	23,6	0,7	31.56	POSITIVO	POSITIVO
	37	5	28,8	28,2	0,6	29.71	POSITIVO	POSITIVO
	238	6	28,7	27,2	1,5	30.53	POSITIVO	POSITIVO
	137	7	22,9	21,7	1,2	33.47	POSITIVO	POSITIVO
	99	8	25,4	23,8	1,6	32.75	POSITIVO	POSITIVO
	14	9	29,2	27,6	1,6	29.02	POSITIVO	POSITIVO
	93	10	32,2	31,0	1,2	29.90	POSITIVO	POSITIVO
	265	11	26,4	25,2	1,2	33.12	POSITIVO	POSITIVO
	257	12	26,2	27,7	-1,6	31.54	POSITIVO	POSITIVO
	190	13	31,5	30,5	1,0	29.61	POSITIVO	POSITIVO
	242	14	32,8	45,0		30.22	POSITIVO	POSITIVO
	59	15	45,0	45,0		29.20	NEGATIVO	NEGATIVO
	206	16	45,0	45,0		29.10	NEGATIVO	NEGATIVO
	50	17	45,0	45,0		29.31	NEGATIVO	NEGATIVO
	180	18	39,1	45,0		29.03	NEGATIVO	NEGATIVO
	154	19	43,2	45,0		29.01	NEGATIVO	NEGATIVO
	244	20	39,0	45,0		31.60	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	QIAamp viral RNA mini kit
Strumento	7900 HT
Soglia Ct BTV	38
Soglia Ct IPC	32

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
377	229	1	23,9	26,5	-2,6	29.3	POSITIVO	POSITIVO
	86	2	24,5	26,8	-2,3	30.3	POSITIVO	POSITIVO
	212	3	22,6	22,5	0,1	30.6	POSITIVO	POSITIVO
	256	4	21,5	23,6	-2,1	30.9	POSITIVO	POSITIVO
	232	5	29,2	28,2	1,0	29.4	POSITIVO	POSITIVO
	33	6	25,9	27,2	-1,3	28.9	POSITIVO	POSITIVO
	226	7	20,9	21,7	-0,8	32.4	POSITIVO	POSITIVO
	149	8	23,6	23,8	-0,2	29.6	POSITIVO	POSITIVO
	80	9	26,2	27,6	-1,4	29.6	POSITIVO	POSITIVO
	255	10	30,3	31,0	-0,7	30.1	POSITIVO	POSITIVO
	87	11	23,2	25,2	-2,0	30.2	POSITIVO	POSITIVO
	52	12	28,0	27,7	0,3	29.6	POSITIVO	POSITIVO
	6	13	26,5	30,5	-4,0	28.4	POSITIVO	POSITIVO
	219	14	45,0	45,0		30.7	NEGATIVO	POSITIVO
	118	15	45,0	45,0		29.9	NEGATIVO	NEGATIVO
	231	16	45,0	45,0		30.5	NEGATIVO	NEGATIVO
	266	17	45,0	45,0		29.6	NEGATIVO	NEGATIVO
	184	18	45,0	45,0		30	NEGATIVO	NEGATIVO
	26	19	45,0	45,0		29.5	NEGATIVO	NEGATIVO
	71	20	45,0	45,0		29.4	NEGATIVO	NEGATIVO

Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	AB One Step Master Mix
Kit estrazione	QIAamp Cador Pathogen
Strumento	7900 HT
Soglia Ct BTV	0,111
Soglia Ct IPC	0,057

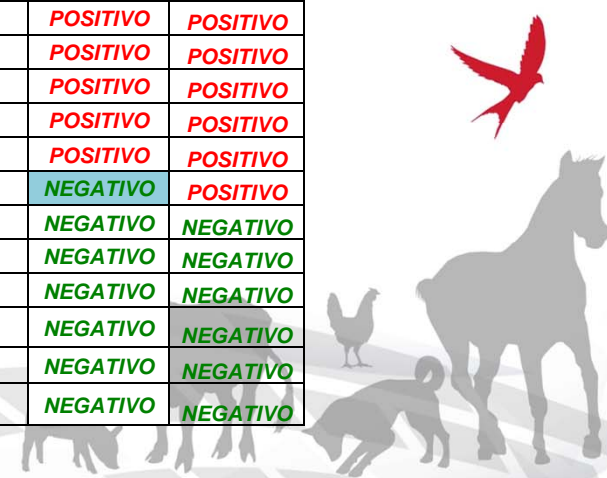
ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
378	67	1	25,5	26,5	-1,0	30.14	POSITIVO	POSITIVO
	160	2	26,2	26,8	-0,6	33.60	POSITIVO	POSITIVO
	31	3	21,8	22,5	-0,7	29.24	POSITIVO	POSITIVO
	202	4	24,4	23,6	0,8	34.13	POSITIVO	POSITIVO
	72	5	30,4	28,2	2,2	30.56	POSITIVO	POSITIVO
	140	6	27,0	27,2	-0,2	31.61	POSITIVO	POSITIVO
	56	7	19,8	21,7	-1,9	30.53	POSITIVO	POSITIVO
	106	8	23,3	23,8	-0,5	29.62	POSITIVO	POSITIVO
	197	9	26,9	27,6	-0,7	32.39	POSITIVO	POSITIVO
	116	10	30,1	31,0	-0,9	30.75	POSITIVO	POSITIVO
	32	11	26,0	25,2	0,8	29.50	POSITIVO	POSITIVO
	51	12	29,6	27,7	1,9	30.64	POSITIVO	POSITIVO
	178	13	29,7	30,5	-0,8	30.88	POSITIVO	POSITIVO
	119	14	40,0	45,0		31.12	NEGATIVO	POSITIVO
	125	15	40,0	45,0		33.91	NEGATIVO	NEGATIVO
	208	16	40,0	45,0		34.05	NEGATIVO	NEGATIVO
	4	17	40,0	45,0		29.68	NEGATIVO	NEGATIVO
	272	18	40,0	45,0		29.76	NEGATIVO	NEGATIVO
	66	19	40,0	45,0		30.20	NEGATIVO	NEGATIVO
	147	20	40,0	45,0		34.63	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	Trizol
Strumento	CFX96
Soglia Ct BTV	38
Soglia Ct IPC	36

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTV		Ct BTV (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
380	24	1	22,2	26,5	-4,3	29.44	POSITIVO	POSITIVO
	1	2	26,4	26,8	-0,4	29.36	POSITIVO	POSITIVO
	27	3	22,4	22,5	-0,1	28.93	POSITIVO	POSITIVO
	228	4	23,6	23,6	0,0	30.08	POSITIVO	POSITIVO
	227	5	30,0	28,2	1,8	29.89	POSITIVO	POSITIVO
	100	6	26,2	27,2	-1,1	29	POSITIVO	POSITIVO
	92	7	20,7	21,7	-1,0	27.99	POSITIVO	POSITIVO
	91	8	24,1	23,8	0,3	28	POSITIVO	POSITIVO
	205	9	27,4	27,6	-0,2	29.48	POSITIVO	POSITIVO
	240	10	31,4	31,0	0,4	30.36	POSITIVO	POSITIVO
	236	11	24,3	25,2	-0,9	29.05	POSITIVO	POSITIVO
	126	12	27,9	27,7	0,2	29.63	POSITIVO	POSITIVO
	195	13	30,4	30,5	-0,1	30.24	POSITIVO	POSITIVO
	198	14	45	45,0		30.12	NEGATIVO	POSITIVO
	216	15	45	45,0		30.15	NEGATIVO	NEGATIVO
	111	16	45	45,0		30.09	NEGATIVO	NEGATIVO
	15	17	45	45,0		30.38	NEGATIVO	NEGATIVO
	44	18	45	45,0		30.24	NEGATIVO	NEGATIVO
	53	19	45	45,0		30.08	NEGATIVO	NEGATIVO
	133	20	45	45,0		30.45	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

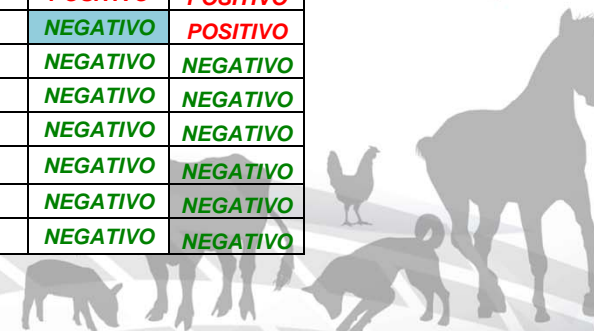
Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	7900 HT
Soglia Ct BTM	<38
Soglia Ct IPC	<37

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTM		Ct BTM (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
390	34	1	26,7	26,5	0,2	32.9	POSITIVO	POSITIVO
	73	2	27,3	26,8	0,5	33.9	POSITIVO	POSITIVO
	203	3	22,0	22,5	-0,5	34.8	POSITIVO	POSITIVO
	237	4	23,2	23,6	-0,4	34.8	POSITIVO	POSITIVO
	248	5	29,3	28,2	1,1	33.2	POSITIVO	POSITIVO
	191	6	26,9	27,2	-0,3	30.3	POSITIVO	POSITIVO
	217	7	22,0	21,7	0,3	37.3	POSITIVO	POSITIVO
	120	8	24,6	23,8	0,8	34.1	POSITIVO	POSITIVO
	224	9	27,6	27,6	0,0	33.2	POSITIVO	POSITIVO
	112	10	30,8	31,0	-0,2	32.7	POSITIVO	POSITIVO
	68	11	25,6	25,2	0,4	33.8	POSITIVO	POSITIVO
	138	12	28,7	27,7	1,0	33.5	POSITIVO	POSITIVO
	30	13	30,6	30,5	0,1	32.7	POSITIVO	POSITIVO
	176	14	45,0	45,0		32.9	NEGATIVO	POSITIVO
	96	15	45,0	45,0		33.1	NEGATIVO	NEGATIVO
	74	16	45,0	45,0		33.6	NEGATIVO	NEGATIVO
	269	17	45,0	45,0		32.7	NEGATIVO	NEGATIVO
	215	18	45,0	45,0		32.7	NEGATIVO	NEGATIVO
	274	19	45,0	45,0		32.4	NEGATIVO	NEGATIVO
	122	20	45,0	45,0		32.2	NEGATIVO	NEGATIVO

Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	7900 HT
Soglia Ct BTM	<40
Soglia Ct IPC	32 +/- 3

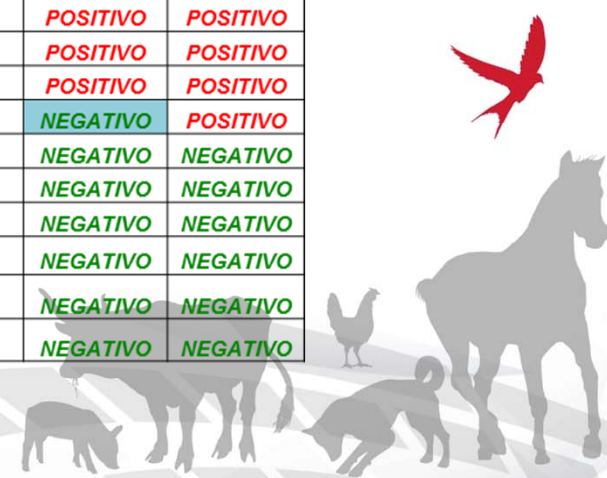
ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTM		Ct BTM (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
594	123	1	26,7	26,5	0,2	30.48	POSITIVO	POSITIVO
	171	2	26,4	26,8	-0,4	28.12	POSITIVO	POSITIVO
	117	3	22,6	22,5	0,1	35	POSITIVO	POSITIVO
	211	4	23,5	23,6	-0,1	35	POSITIVO	POSITIVO
	194	5	29,6	28,2	1,4	28.27	POSITIVO	POSITIVO
	9	6	26,5	27,2	-0,7	26.63	POSITIVO	POSITIVO
	279	7	21,7	21,7	0,0	30.05	POSITIVO	POSITIVO
	94	8	24,9	23,8	1,1	29.25	POSITIVO	POSITIVO
	218	9	27,9	27,6	0,3	30.69	POSITIVO	POSITIVO
	10	10	31,4	31,0	0,4	26.45	POSITIVO	POSITIVO
	153	11	27,0	25,2	1,8	27.70	POSITIVO	POSITIVO
	5	12	29,7	27,7	2,0	28.69	POSITIVO	POSITIVO
	273	13	29,8	30,5	-0,7	28.42	POSITIVO	POSITIVO
	275	14	45	45,0		29.65	NEGATIVO	POSITIVO
	173	15	45	45,0		29.00	NEGATIVO	NEGATIVO
	139	16	45	45,0		28.40	NEGATIVO	NEGATIVO
	179	17	45	45,0		29.45	NEGATIVO	NEGATIVO
	182	18	45	45,0		29.84	NEGATIVO	NEGATIVO
	16	19	45	45,0		29.25	NEGATIVO	NEGATIVO
	245	20	45	45,0		28.89	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	7500 Fast Applied Biosystems
Soglia Ct BTv	38
Soglia Ct IPC	32+ -3

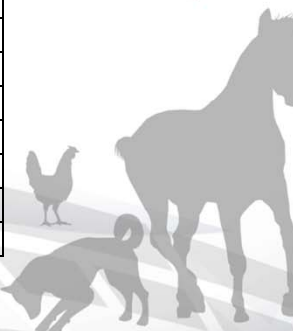
ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTv		Ct BTv (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
619	21	1	30,01	26,5	3,51	31.77	POSITIVO	POSITIVO
	207	2	29,99	26,8	3,19	31.98	POSITIVO	POSITIVO
	148	3	25,62	22,5	3,12	32.29	POSITIVO	POSITIVO
	163	4	27,46	23,6	3,86	31.70	POSITIVO	POSITIVO
	83	5	35,22	28,2	7,02	31.22	POSITIVO	POSITIVO
	131	6	30,21	27,2	3,01	32.01	POSITIVO	POSITIVO
	221	7	25,39	21,7	3,69	32.58	POSITIVO	POSITIVO
	263	8	28,69	23,8	4,89	31.59	POSITIVO	POSITIVO
	65	9	31,26	27,6	3,66	31.78	POSITIVO	POSITIVO
	41	10	34,95	31,0	3,95	31.41	POSITIVO	POSITIVO
	144	11	28,92	25,2	3,72	31.90	POSITIVO	POSITIVO
	213	12	32,37	27,7	4,67	31.73	POSITIVO	POSITIVO
	235	13	35,37	30,5	4,87	31.87	POSITIVO	POSITIVO
	175	14	45,00	45,0		31.36	NEGATIVO	POSITIVO
	253	15	45,00	45,0		31.59	NEGATIVO	NEGATIVO
	12	16	45,00	45,0		31.45	NEGATIVO	NEGATIVO
	8	17	45,00	45,0		31.59	NEGATIVO	NEGATIVO
	199	18	45,00	45,0		31.46	NEGATIVO	NEGATIVO
	57	19	45,00	45,0		31.23	NEGATIVO	NEGATIVO
	222	20	45,00	45,0		31.65	NEGATIVO	NEGATIVO



Risultati (test quantitativo)

Kit amplificazione	SuperScript III
Kit estrazione	HPV
Strumento	7500 Fast Applied Biosystems
Soglia Ct BTM	38
Soglia Ct IPC	32+-3

ID laboratorio	ID campione casuale	ID campione	Ct BTM		Ct BTM (R-A)	Ct IPC Registrati	Risultato registrato	Risultato atteso
			Registrati	Attesi				
681	114	1	29,5	26,5	3,0	32.48	POSITIVO	POSITIVO
	155	2	29,7	26,8	2,9	32.31	POSITIVO	POSITIVO
	258	3	26,1	22,5	3,6	33.99	POSITIVO	POSITIVO
	158	4	27,2	23,6	3,6	32.23	POSITIVO	POSITIVO
	170	5	33,4	28,2	5,2	32.37	POSITIVO	POSITIVO
	36	6	29,7	27,2	2,5	32.45	POSITIVO	POSITIVO
	262	7	25,0	21,7	3,3	33.18	POSITIVO	POSITIVO
	167	8	27,6	23,8	3,8	32.56	POSITIVO	POSITIVO
	128	9	31,6	27,6	4,0	32.24	POSITIVO	POSITIVO
	62	10	35,7	31,0	4,7	31.91	POSITIVO	POSITIVO
	127	11	29,5	25,2	4,3	32.45	POSITIVO	POSITIVO
	40	12	32,0	27,7	4,3	32.07	POSITIVO	POSITIVO
	54	13	33,1	30,5	2,6	32.22	POSITIVO	POSITIVO
	90	14	45,0	45,0		32	NEGATIVO	POSITIVO
	35	15	45,0	45,0		31.9	NEGATIVO	NEGATIVO
	48	16	45,0	45,0		31.93	NEGATIVO	NEGATIVO
	268	17	45,0	45,0		31.84	NEGATIVO	NEGATIVO
	29	18	45,0	45,0		32.01	NEGATIVO	NEGATIVO
	250	19	45,0	45,0		32.1	NEGATIVO	NEGATIVO
	280	20	45,0	45,0		31.52	NEGATIVO	NEGATIVO



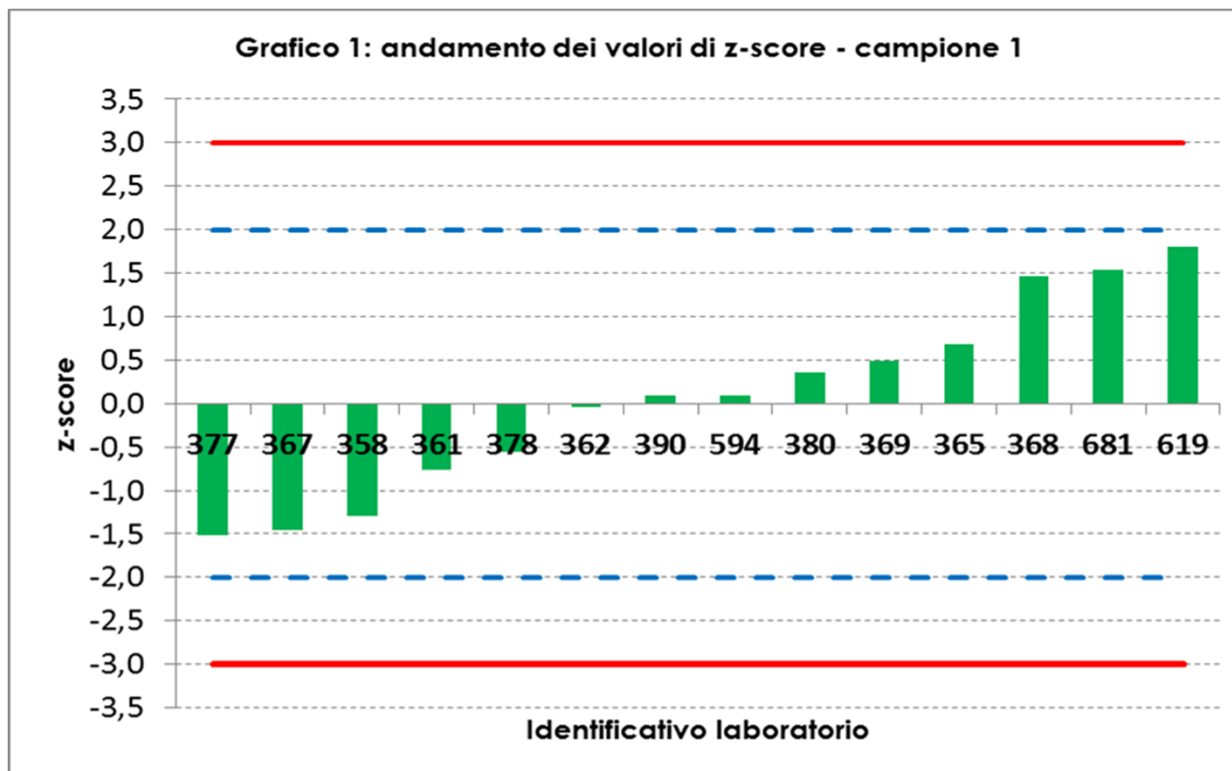
Analisi statistica dei risultati (test quantitativo)



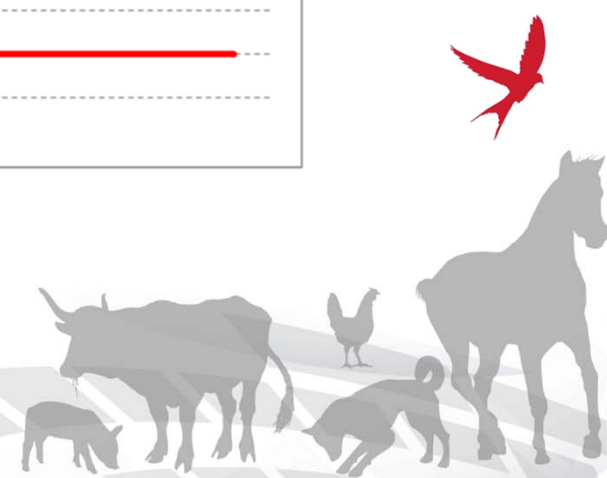
- Calcolo del valore di z-score
- Valutazione della prestazione globale del laboratorio mediante calcolo di un indice definito dalla somma dei quadrati dei valori di z-score del singolo laboratorio (SQZ_{lab})
- Verifica della presenza di errori sistematici nei risultati forniti dai laboratori mediante calcolo dell'indice RSZ basato sulla somma degli z-score
- Stima della percentuale di risultati corretti



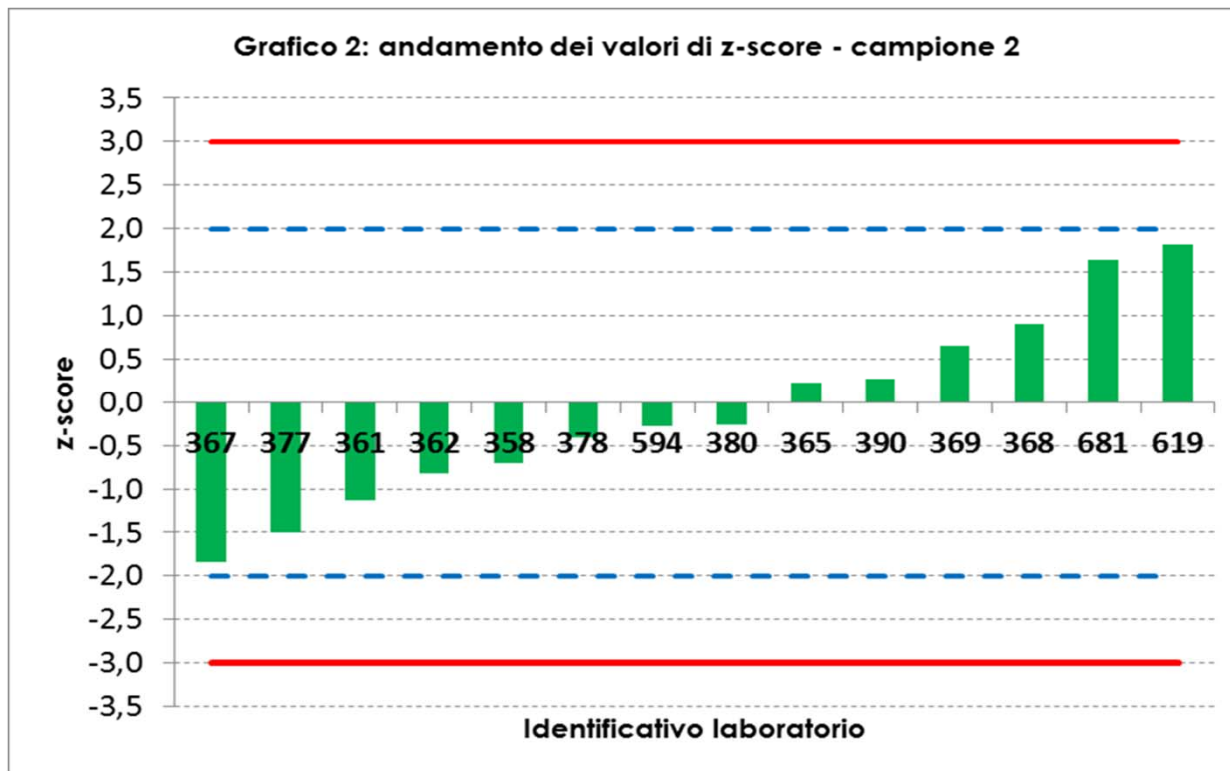
Grafici z-score



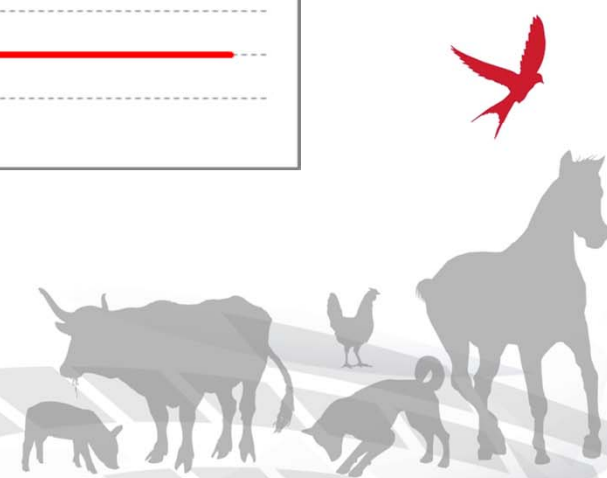
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



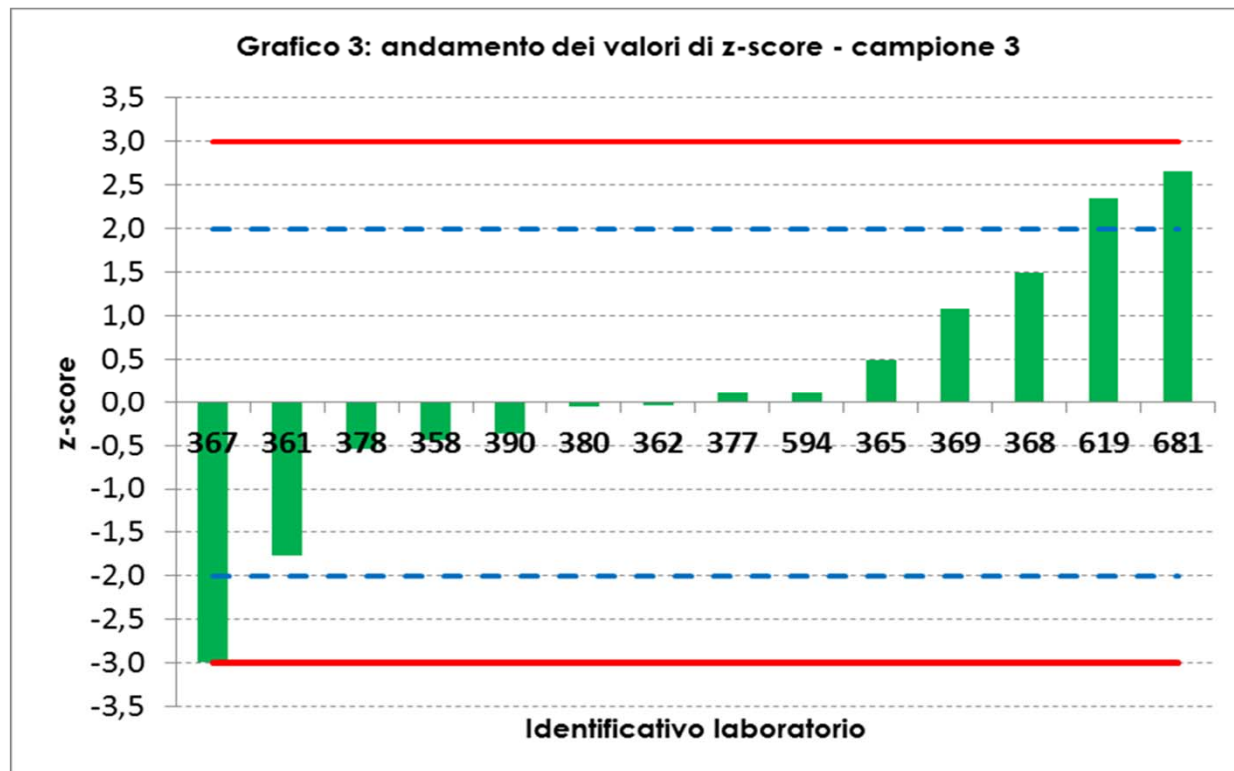
Grafici z-score



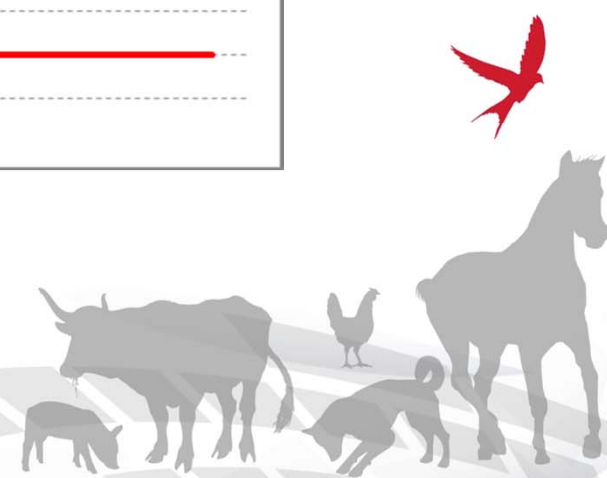
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



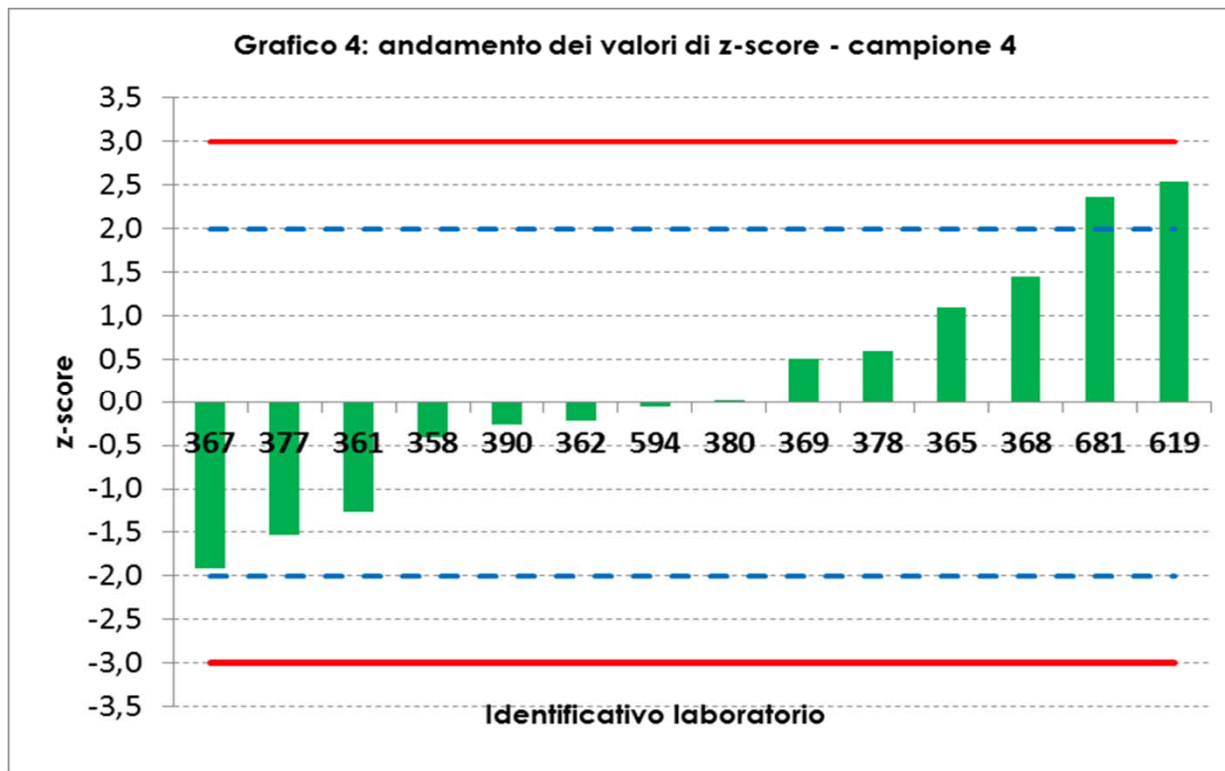
Grafici z-score



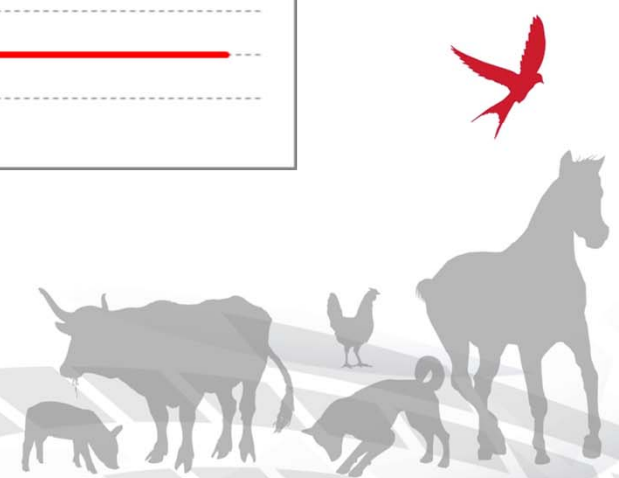
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



Grafici z-score

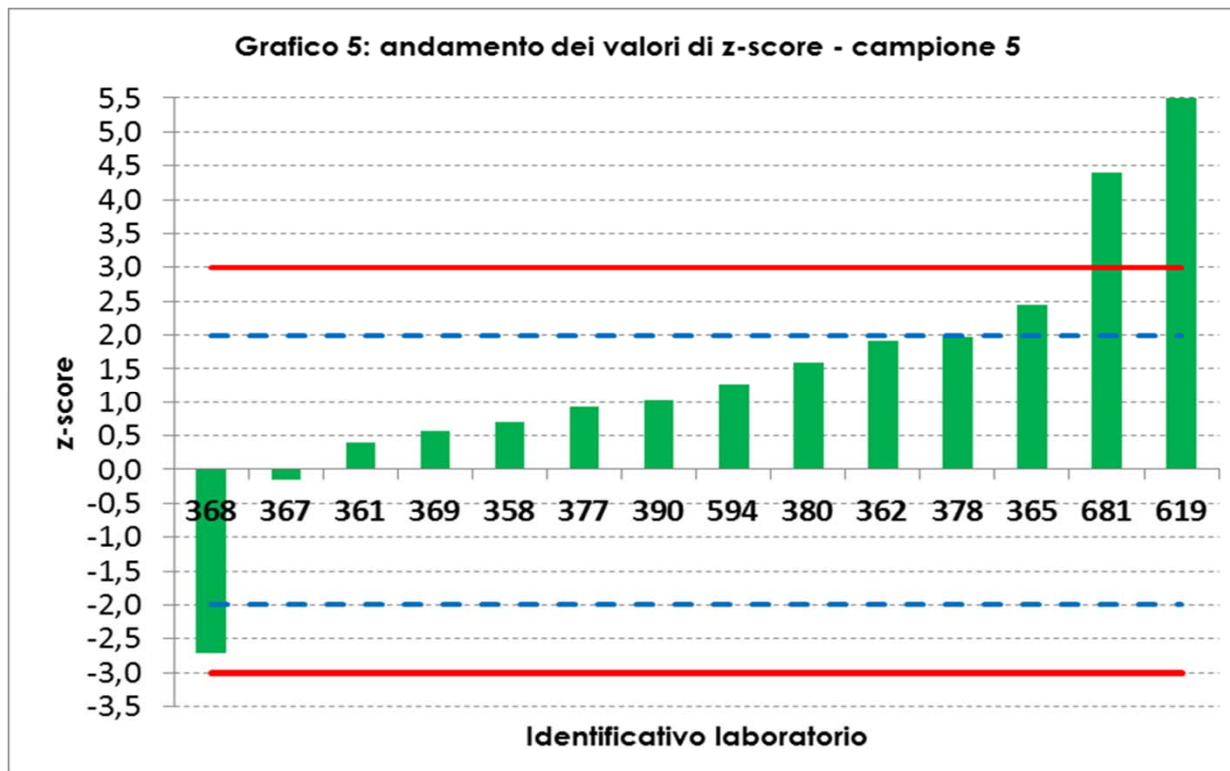


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

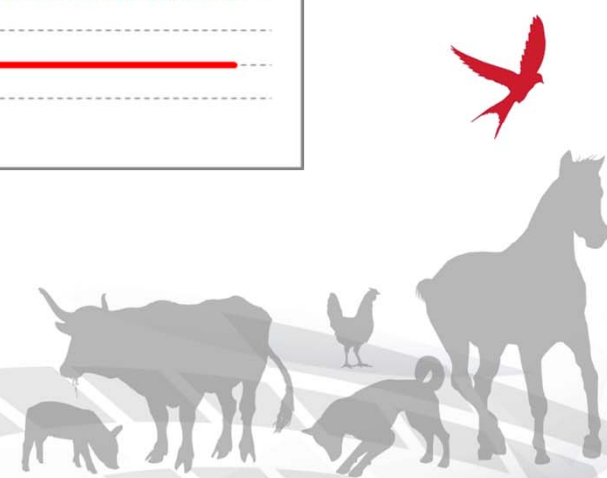


Grafici z-score

Grafico 5: andamento dei valori di z-score - campione 5

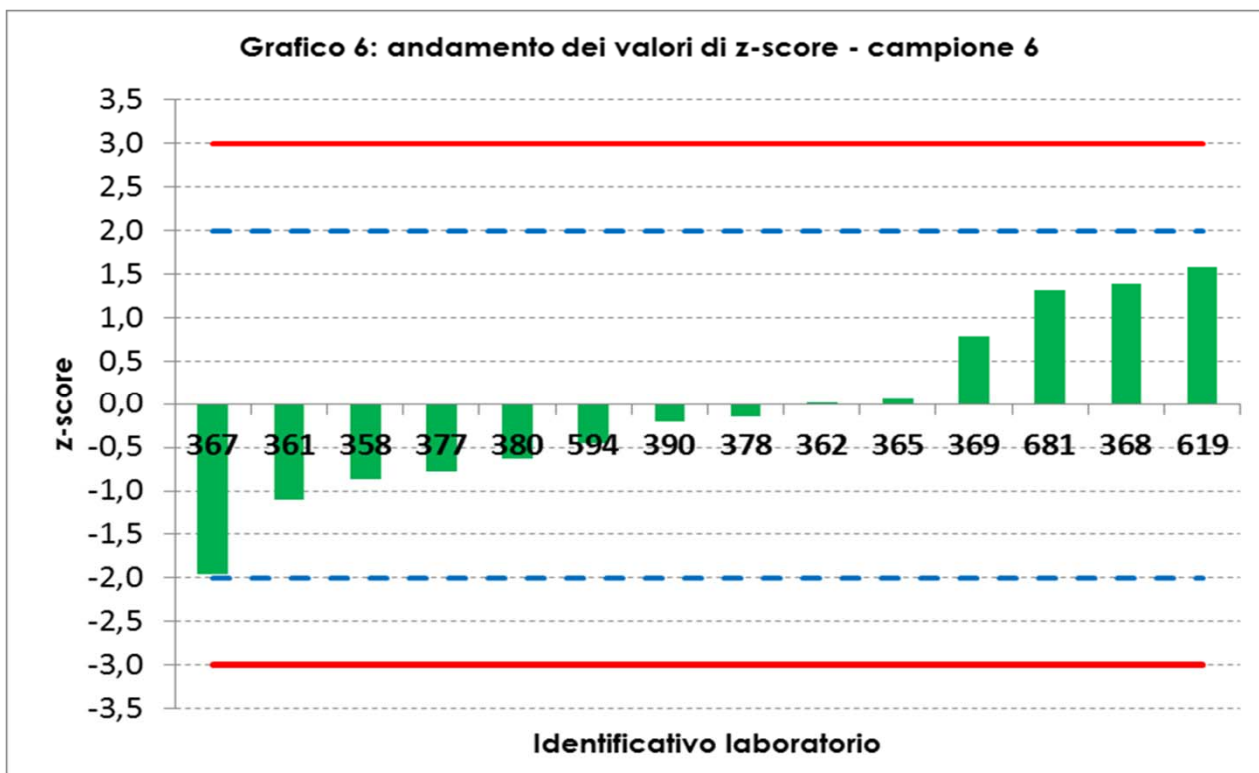


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

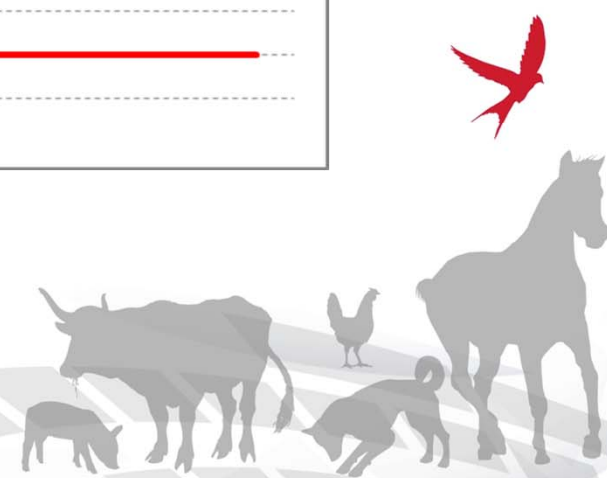


Grafici z-score

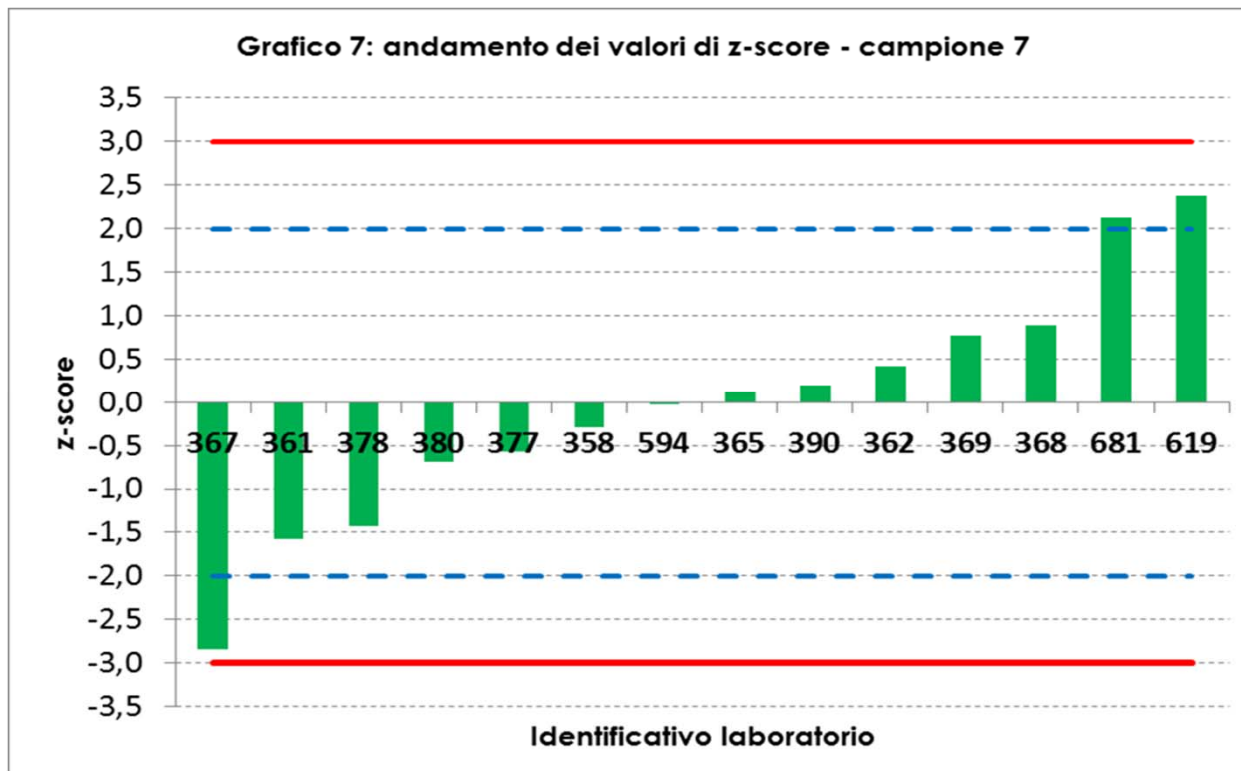
Grafico 6: andamento dei valori di z-score - campione 6



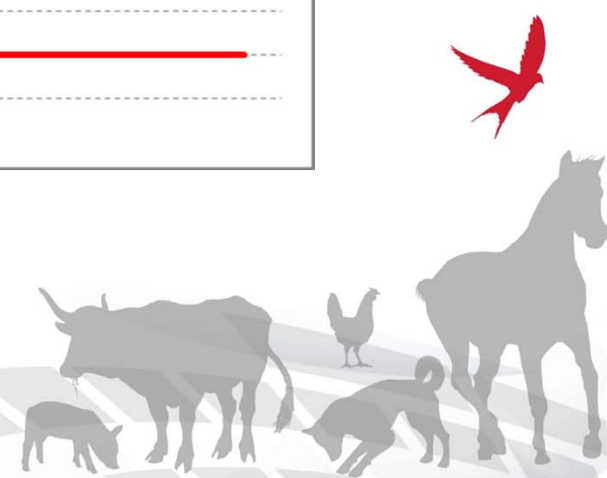
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



Grafici z-score

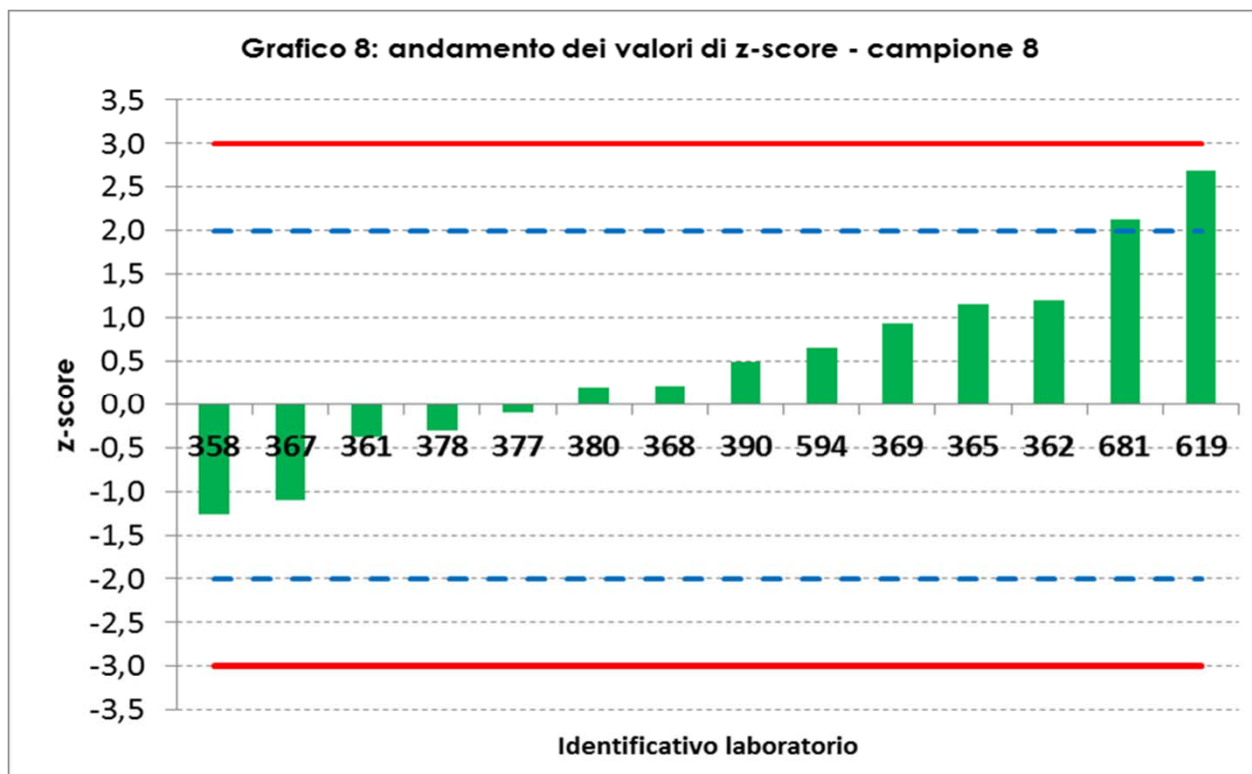


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

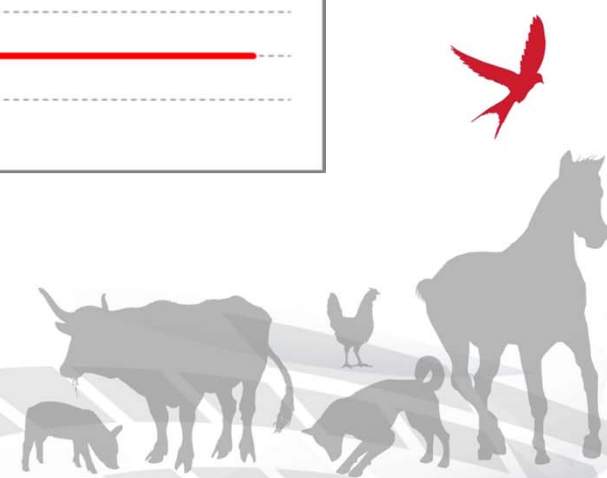


Grafici z-score

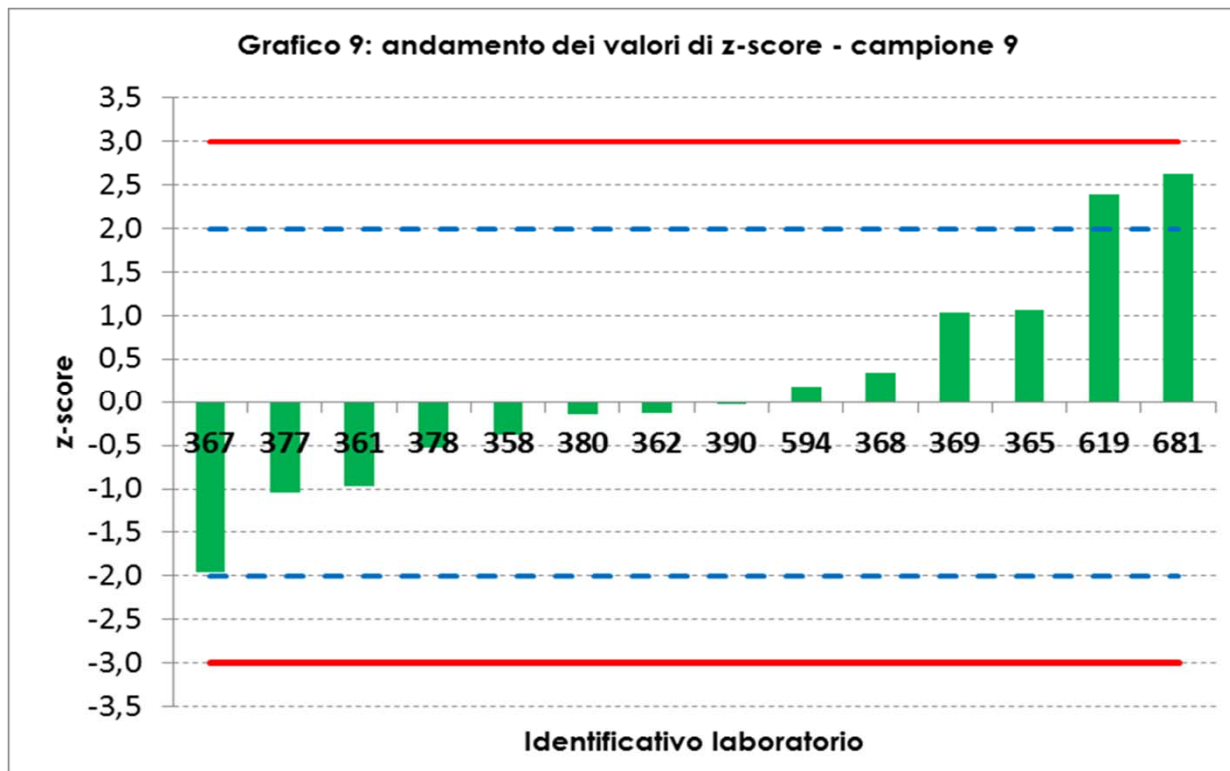
Grafico 8: andamento dei valori di z-score - campione 8



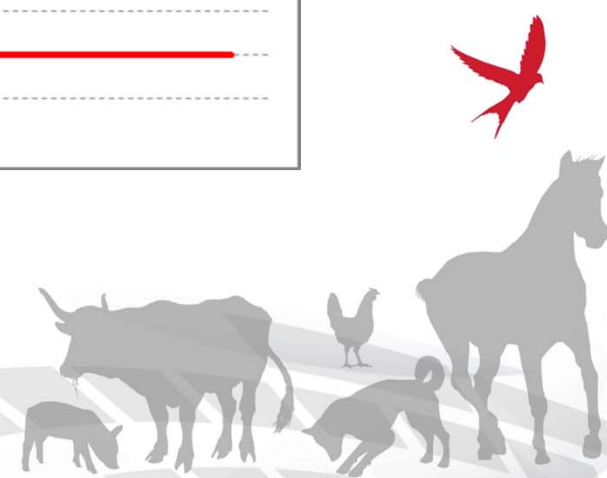
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



Grafici z-score

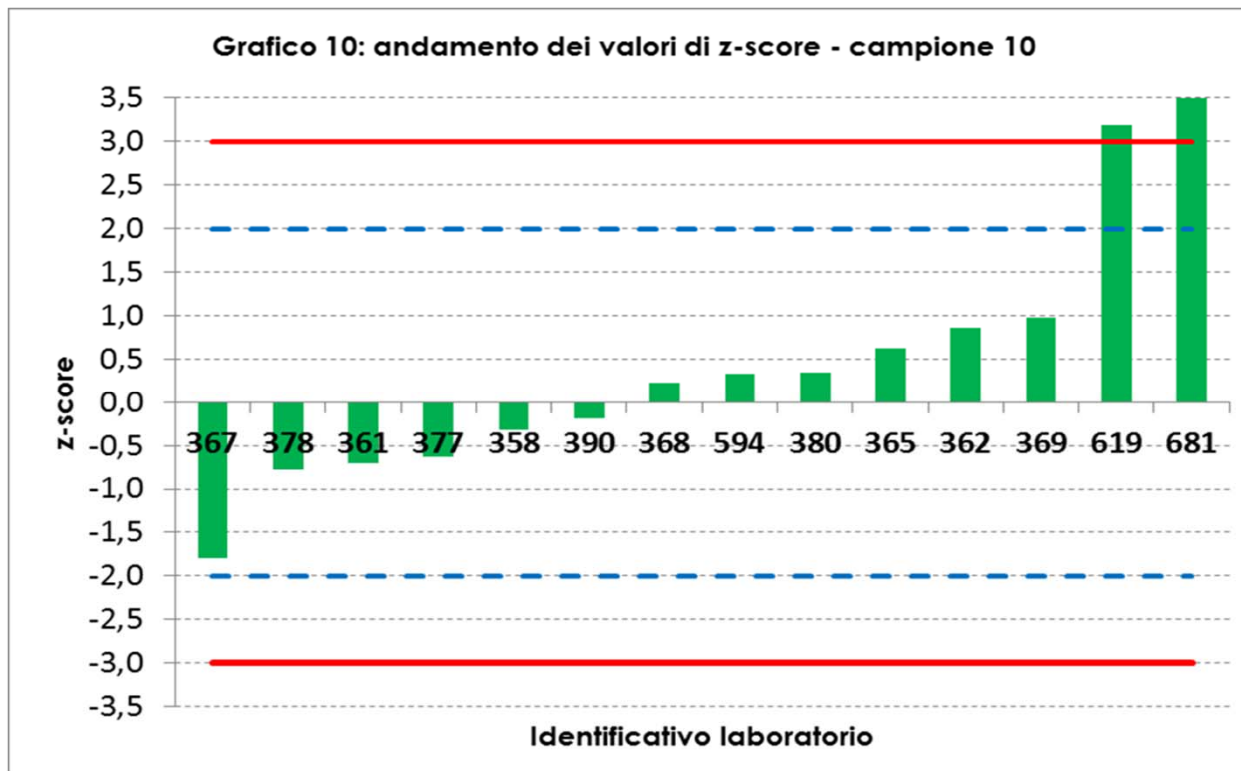


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

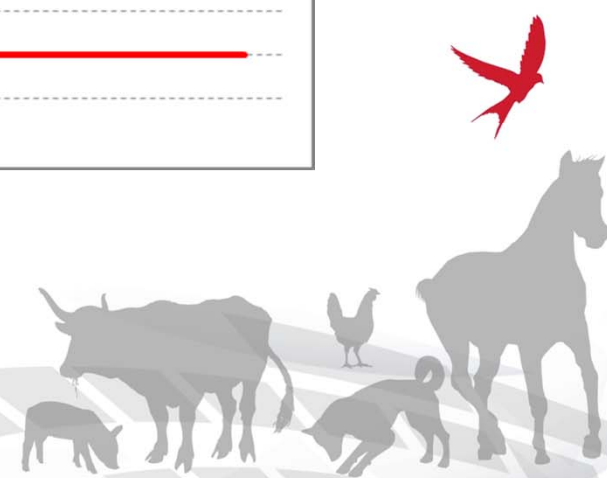


Grafici z-score

Grafico 10: andamento dei valori di z-score - campione 10

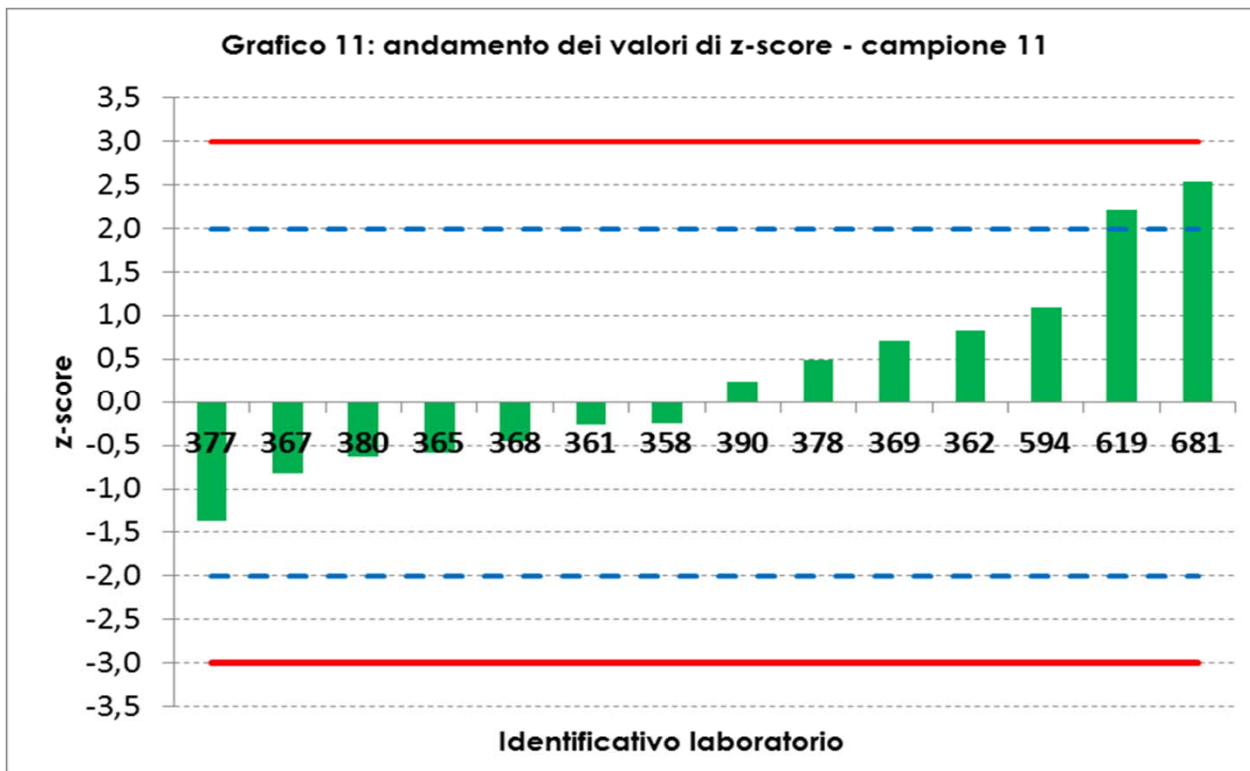


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

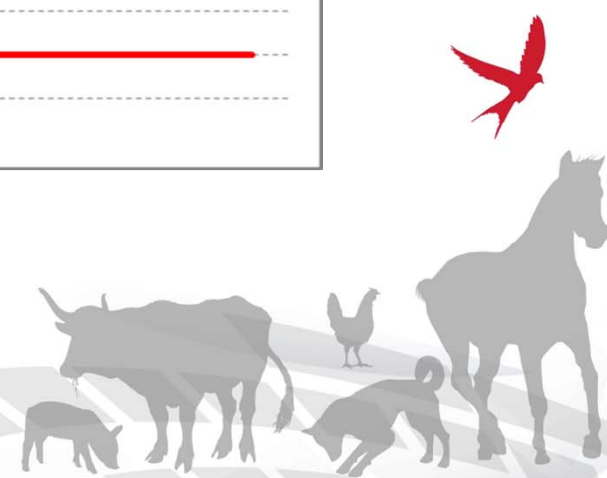


Grafici z-score

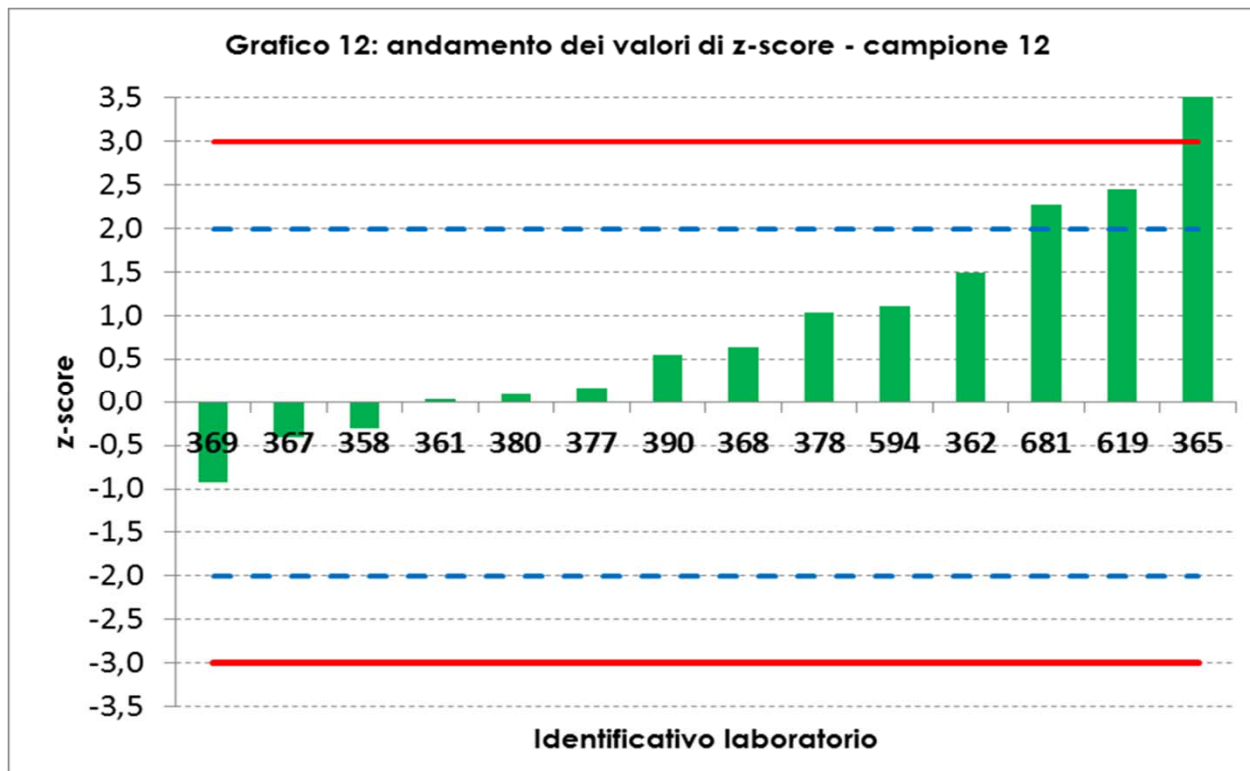
Grafico 11: andamento dei valori di z-score - campione 11



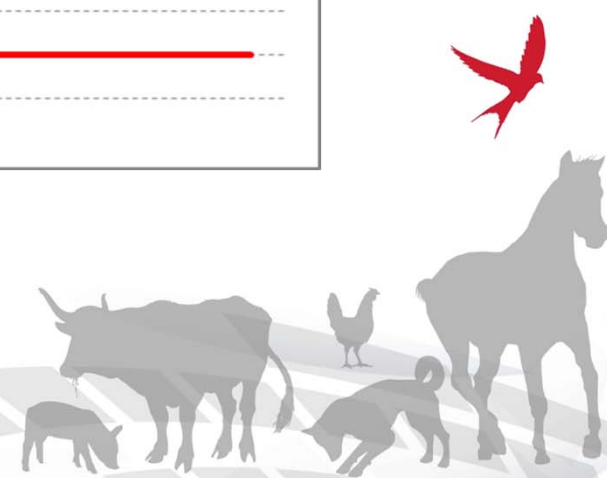
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



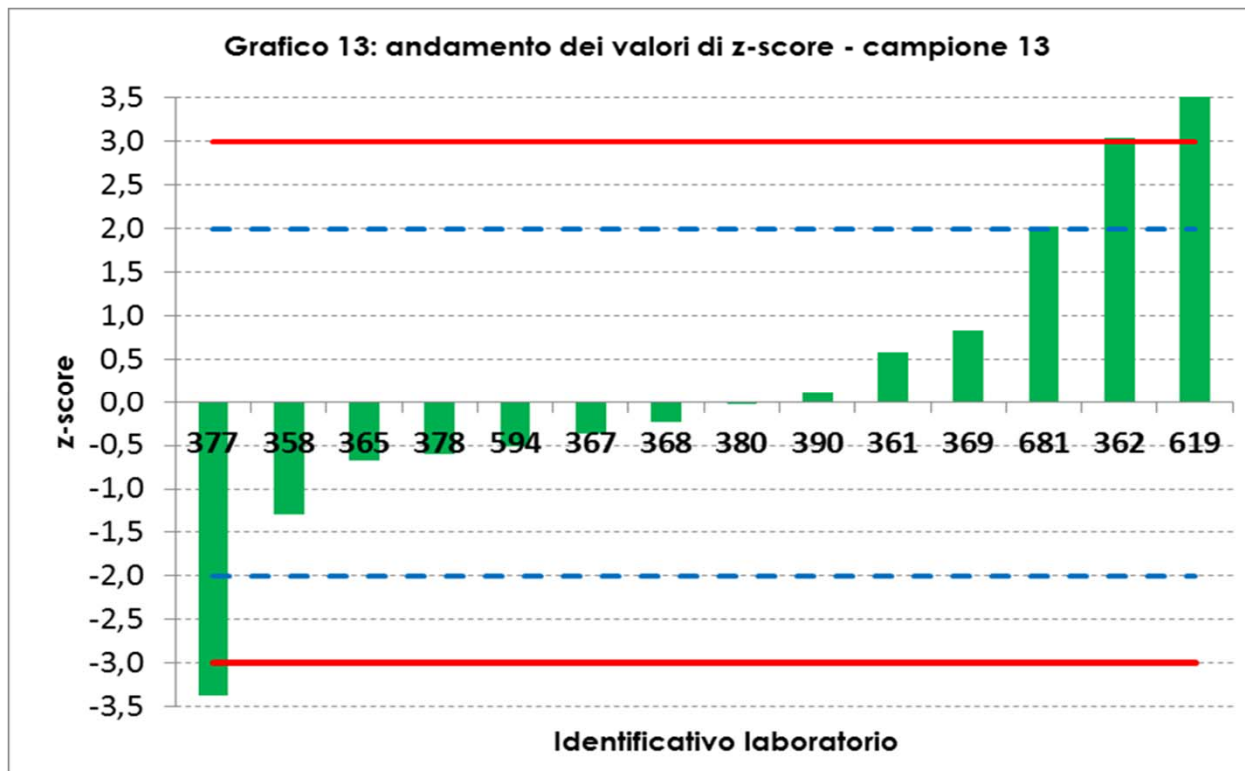
Grafici z-score



$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



Grafici z-score



$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

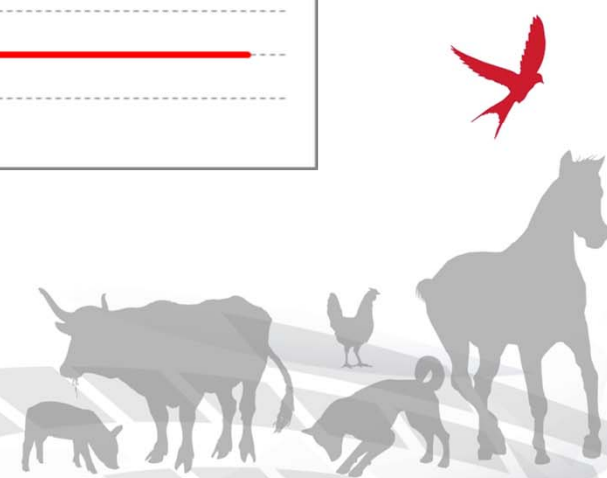
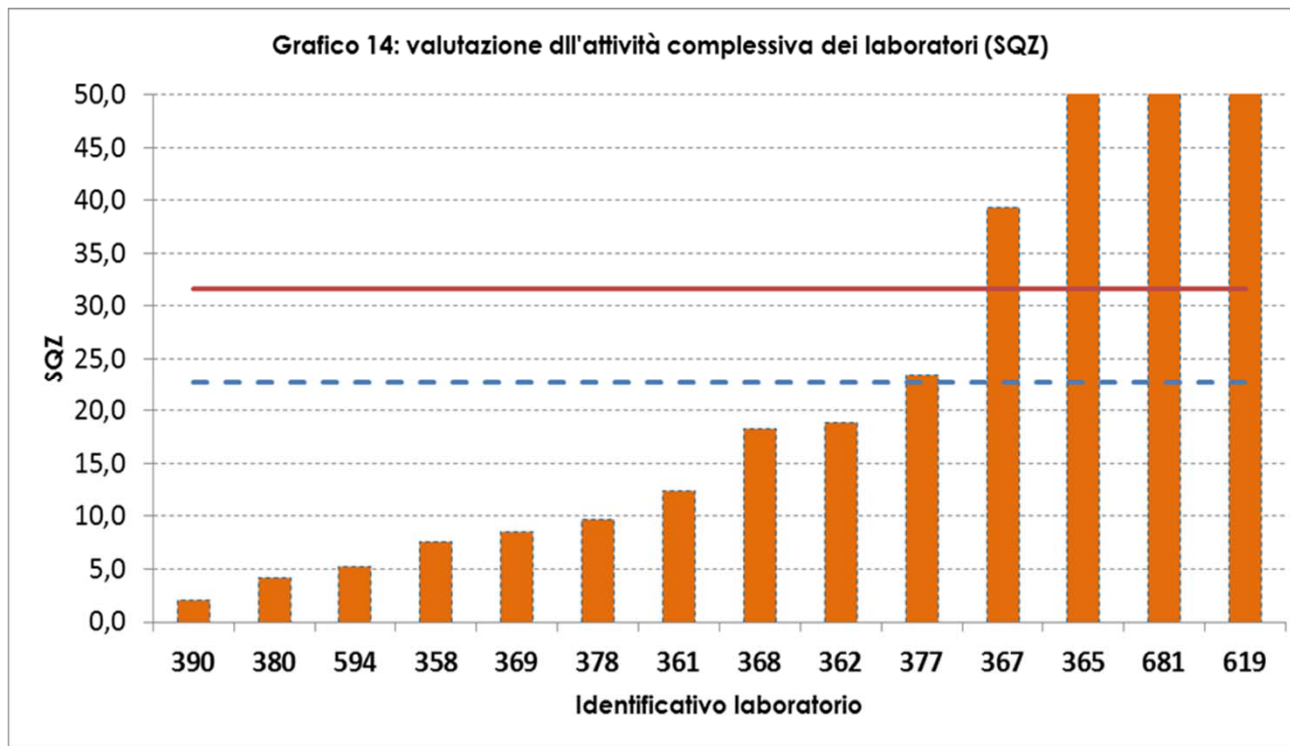


Grafico SQZ



$SQZ_{lab} \leq SQZ$ ($\alpha = 0,0455$; n)

soddisfacente

SQZ ($\alpha = 0,0455$; n) $\leq SQZ_{lab} \leq SQZ$ ($\alpha = 0,0027$; n)

discutibile

$SQZ_{lab} \geq SQZ$ ($\alpha = 0,0027$; n)

insoddisfacente

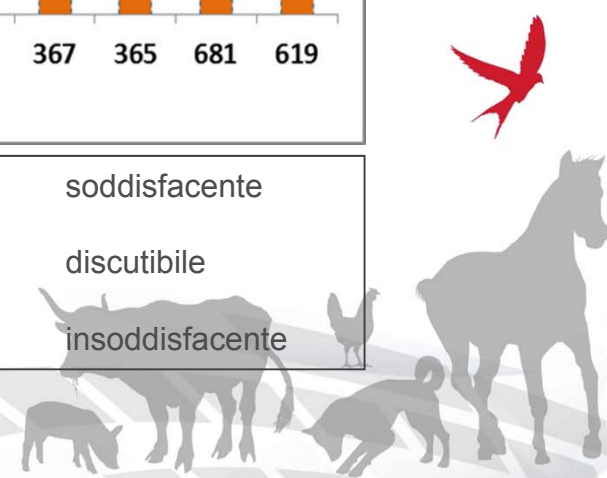
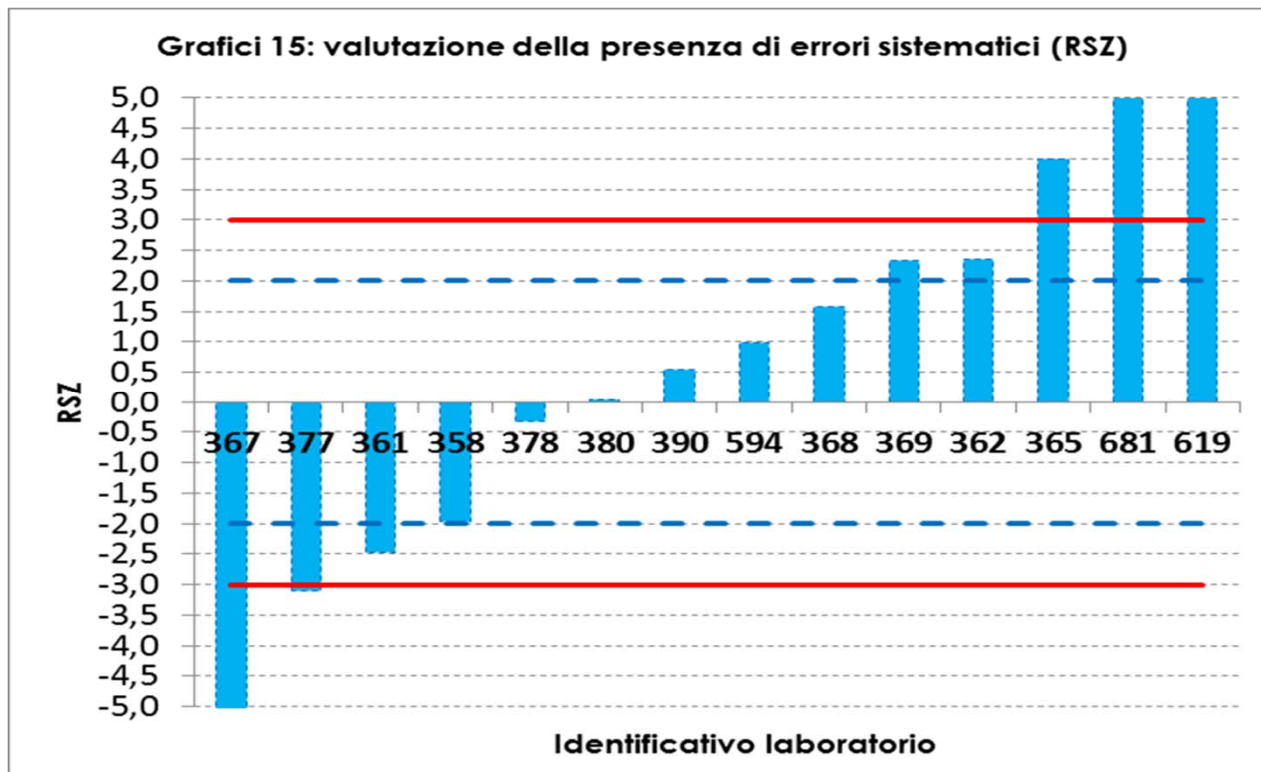
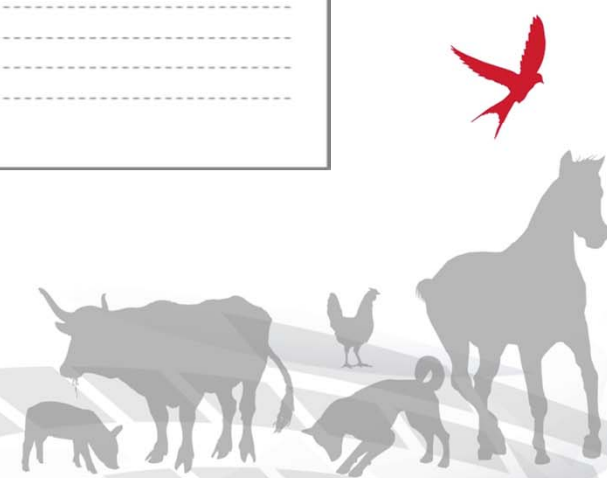


Grafico RSZ



$ RSZ \leq 2$	soddisfacente
$2 < RSZ < 3$	discutibile
$ RSZ \geq 3$	insoddisfacente

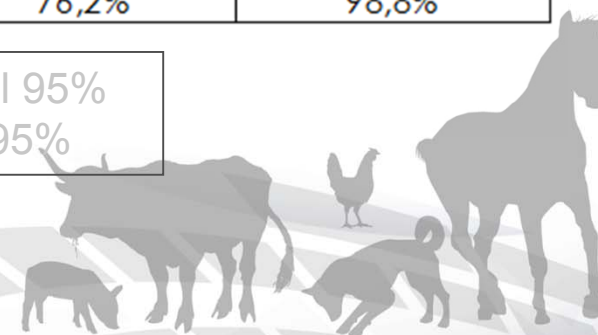


Stima percentuale risultati corretti

Identificativo laboratorio	esaminati	corretti	errati	I.c.i. 95%	I.c.s. 95%
358	20	18	2	69,6%	97,0%
361	20	20	0	86,7%	100,0%
362	20	19	1	76,2%	98,8%
365	20	16	4	58,1%	91,8%
367	20	16	4	58,1%	91,8%
368	20	19	1	76,2%	98,8%
369	20	20	0	86,7%	100,0%
377	20	19	1	76,2%	98,8%
378	20	19	1	76,2%	98,8%
380	20	19	1	76,2%	98,8%
390	20	19	1	76,2%	98,8%
594	20	19	1	76,2%	98,8%
619	20	19	1	76,2%	98,8%
681	20	19	1	76,2%	98,8%

I.c.s. 95%: limite superiore intervallo di confidenza al 95%

I.c.i. 95%: limite inferiore intervallo di confidenza al 95%





 **CESME**
Centro di Referenza Nazionale

Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



- Prestazione globale (SQZ): soddisfacente per 9 laboratori, discutibile per il laboratorio **377**, mentre insoddisfacente per i laboratori **365**, **367**, **619** e **681**
- Errori sistematici (RSZ): risultati soddisfacenti per 6 laboratori, discutibili per i laboratori **361**, **362** e **369**, insoddisfacenti per i laboratori **365**, **367**, **377**, **619** e **681**

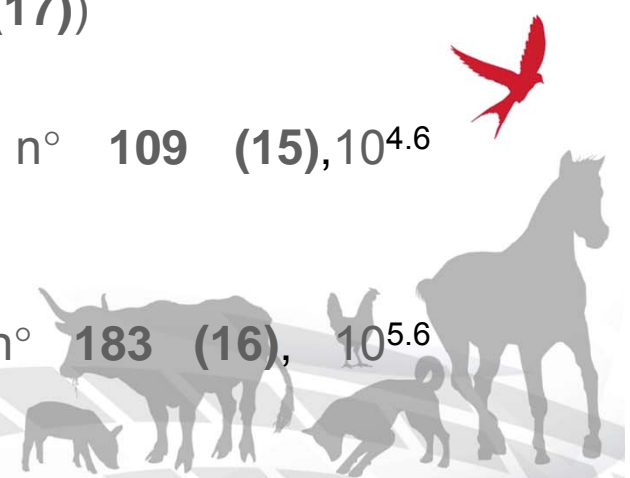


Risultati real time RT-PCR

Utilizzando il metodo real time RT-PCR, 2 laboratori su 14 hanno correttamente individuato tutti i campioni del pannello in esame.

Risultati non corretti:

- Ceppo BTV26 (**(14)** $10^{3.9}$ TCID₅₀/ml, 12 laboratori errato, laboratori **361** e **369** esatto)
- Ceppo BTV16 (laboratorio **365**, campione n° **101 (12)**, $10^{3.1}$ TCID₅₀/ml)
- Campioni negativi identificati positivi (laboratorio **365**, campione n° **25 (19)**; laboratorio **367**, campioni n° **172 (19)** e **185 (17)**)
- Ceppo EHDV6 (laboratorio **365**, campione n° **109 (15)**, $10^{4.6}$ TCID₅₀/ml)
- Ceppo EHDV7 (laboratorio **367**, campione n° **183 (16)**, $10^{5.6}$ TCID₅₀/ml)



Risultati test qualitativo: stima percentuale risultati corretti



Identificativo laboratorio	esaminati	corretti	errati	I.c.i. 95%	I.c.s. 95%
362	20	19	1	76,2%	98,8%
368	20	18	2	69,6%	97,0%
390	20	19	1	76,2%	98,8%

I.c.s. 95%: limite superiore intervallo di confidenza al 95%
I.c.i. 95%: limite inferiore intervallo di confidenza al 95%





 **CESME**
Centro di Referenza Nazionale

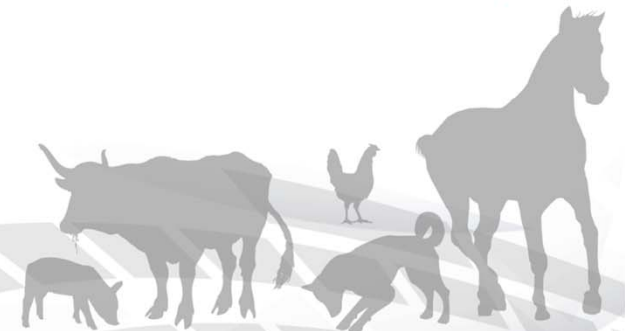
Risultati test qualitativo



Utilizzando il metodo RT-PCR, nessuno dei 3 laboratori ha correttamente individuato tutti i campioni del pannello in esame.

Risultati non corretti:

- Ceppo BTV26 (**(14)** $10^{3,9}$ TCID₅₀/ml, 3 laboratori errato)
- Ceppo BTV9 (laboratorio **368**, campione n° **200 (9)**, $10^{4,1}$ TCID₅₀/ml)





 **CESME**
Centro di Referenza Nazionale



**IZSAM G. CAPORALE
TERAMO**



**Reference Laboratory
Bluetongue**



Grazie per l'attenzione !!

