



IZSAM G.CAPORALE
TERAMO



Reference Laboratory
Bluetongue

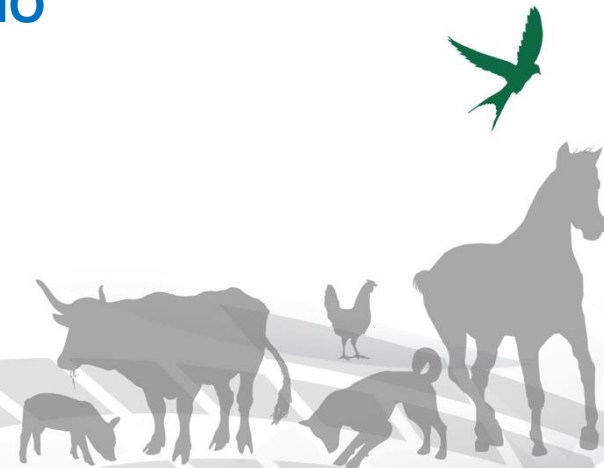
CIRCUITO INTER-LABORATORIO

RT-PCR BLUETONGUE


DISTRIBUZIONE 1/2015

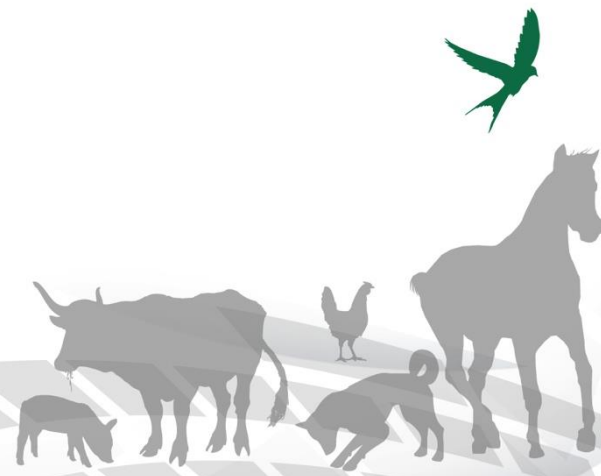
Ottavio Portanti.

«Giornata di studio sulla Bluetongue», IZSAM - Teramo, 25 Novembre 2016.




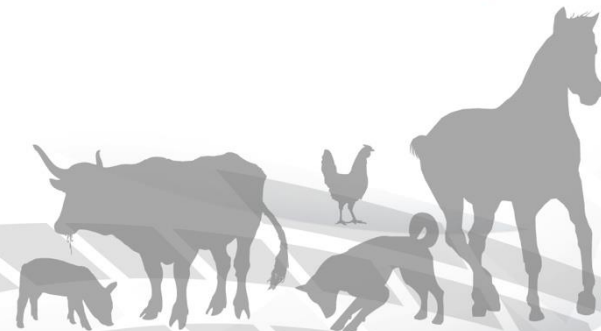
Circuito inter-laboratorio RT-PCR Bluetongue: 1/2015

- 
- Nono circuito inter-laboratorio, 15 laboratori partecipanti
 - Ogni laboratorio ha ricevuto 20 campioni di sangue
 - Ogni campione è stato analizzato con metodo Real-time RT-PCR
 - I campioni di sangue da esaminare sono stati inviati nel mese di dicembre 2015



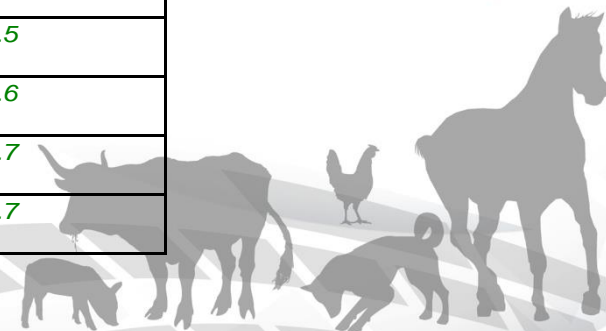
Circuito inter-laboratorio RT-PCR Bluetongue: 1/2015

- 
- I campioni impiegati per il circuito sono stati preparati utilizzando sangue ovino 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	Virus/sierotipo	Titolo (TCID ₅₀ /ml)
1	BTV 1	10 ^{4.9}
2	BTV 1	10 ^{3.9}
3	BTV 1	10 ^{2.9}
4	BTV 1	10 ^{1.9}
5	BTV 1	10 ^{0.9}
6	BTV 4	10 ^{4.8}
7	BTV 4	10 ^{3.8}
8	BTV 4	10 ^{2.8}
9	BTV 4	10 ^{1.8}
10	BTV 4	10 ^{0.8}
11	BTV 2	10 ^{2.9}
12	BTV 8	10 ^{2.9}
13	BTV 16	10 ^{2.5}
14	BTV 24	10 ^{1.6}
15	BTV 26	10 ^{1.7}
16	EHDV 7	10 ^{5.7}




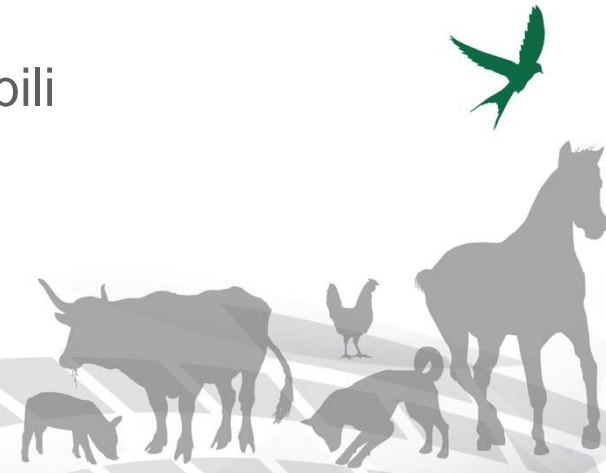
Decodifica campioni

Identificativo Laboratorio

N° campione	358	361	362	365	367	368	369	377	378	380	390	594	681	794	856
1	242	35	82	21	69	205	145	193	152	221	214	46	223	128	140
2	200	113	210	196	191	285	60	258	236	253	299	75	40	220	288
3	257	230	239	42	15	274	59	22	187	284	131	73	215	209	95
4	111	57	52	300	67	32	250	219	249	77	62	101	291	74	150
5	70	226	54	37	171	237	229	79	84	16	261	5	104	273	246
6	123	186	265	18	143	132	162	169	93	201	100	134	260	154	105
7	228	48	45	63	51	235	29	252	149	33	198	98	127	159	174
8	119	254	267	65	86	282	165	39	227	129	168	172	207	248	298
9	19	164	83	43	202	245	133	195	289	185	275	148	17	66	27
10	118	290	89	135	266	34	268	106	292	142	177	203	263	278	125
11	188	72	14	50	76	293	12	184	56	173	160	295	234	277	124
12	157	121	13	61	178	182	166	90	287	158	28	218	272	138	179
13	190	241	269	217	259	107	122	11	115	97	53	81	255	247	212
14	240	130	262	296	167	206	161	88	151	156	294	197	283	153	213
15	264	25	8	232	155	3	2	176	251	55	180	91	270	116	30
16	71	163	47	36	297	222	170	26	281	216	189	139	144	147	102
17	58	271	23	244	199	175	4	231	181	137	280	126	103	85	20
18	141	96	38	146	44	225	279	68	24	136	31	120	109	92	99
19	87	204	208	6	9	112	192	80	243	41	49	238	183	10	276
20	64	224	117	256	78	233	194	94	1	7	110	211	286	114	108

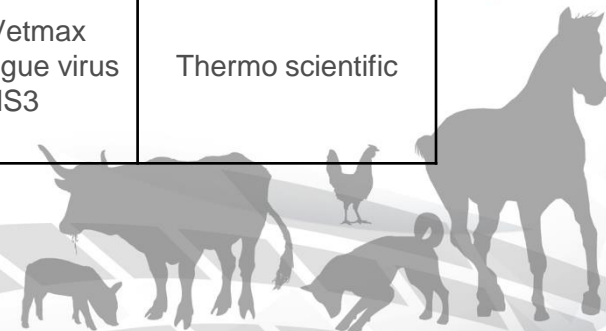
Omogeneità e stabilità dei campioni

- 
- 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 (t0, t1 (24h), t2 (48h) t3 (72h))
 - Tutti i campioni sono risultati omogenei e stabili




Metodi impiegati dai laboratori

	ID laboratorio	Metodo	Procedura	Ente/ditta emittente
Protocollo IZS	358, 361, 362, 365, 367, 368, 369, 377, 380, 390, 594, 681, 794, 856.	Real time RT-PCR	IZS TE B2.1.9 SOP016 "Identificazione mediante RT-PCR real-time "one-step" del virus della Bluetongue". Rev.2	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale" Teramo
Kit commerciale	378.	Real time RT-PCR	LSI Vetmax Bluetongue virus NS3	Thermo scientific



Percentuali di risultati corretti Real-time RT-PCR (test qualitativo)



Identificativo laboratorio	esaminati	corretti	errati	I.c.i. 95%
358	20	20	0	86,7%
361*	20	19	1	76,2%
362	20	20	0	86,7%
365	20	20	0	86,7%
367	20	20	0	86,7%
368	20	20	0	86,7%
369*	20	19	1	76,2%
377	20	20	0	86,7%
378	20	20	0	86,7%
380	20	20	0	86,7%
390	20	20	0	86,7%
594	20	20	0	86,7%
681	20	20	0	86,7%
794	20	20	0	86,7%
856	20	20	0	86,7%

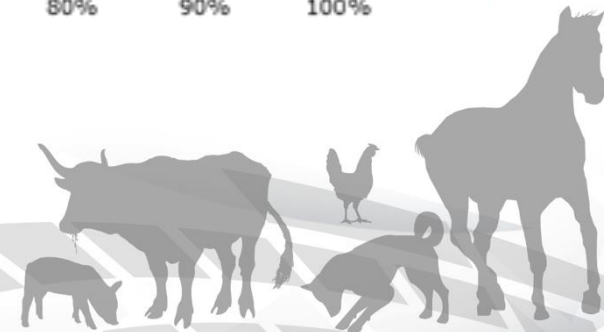
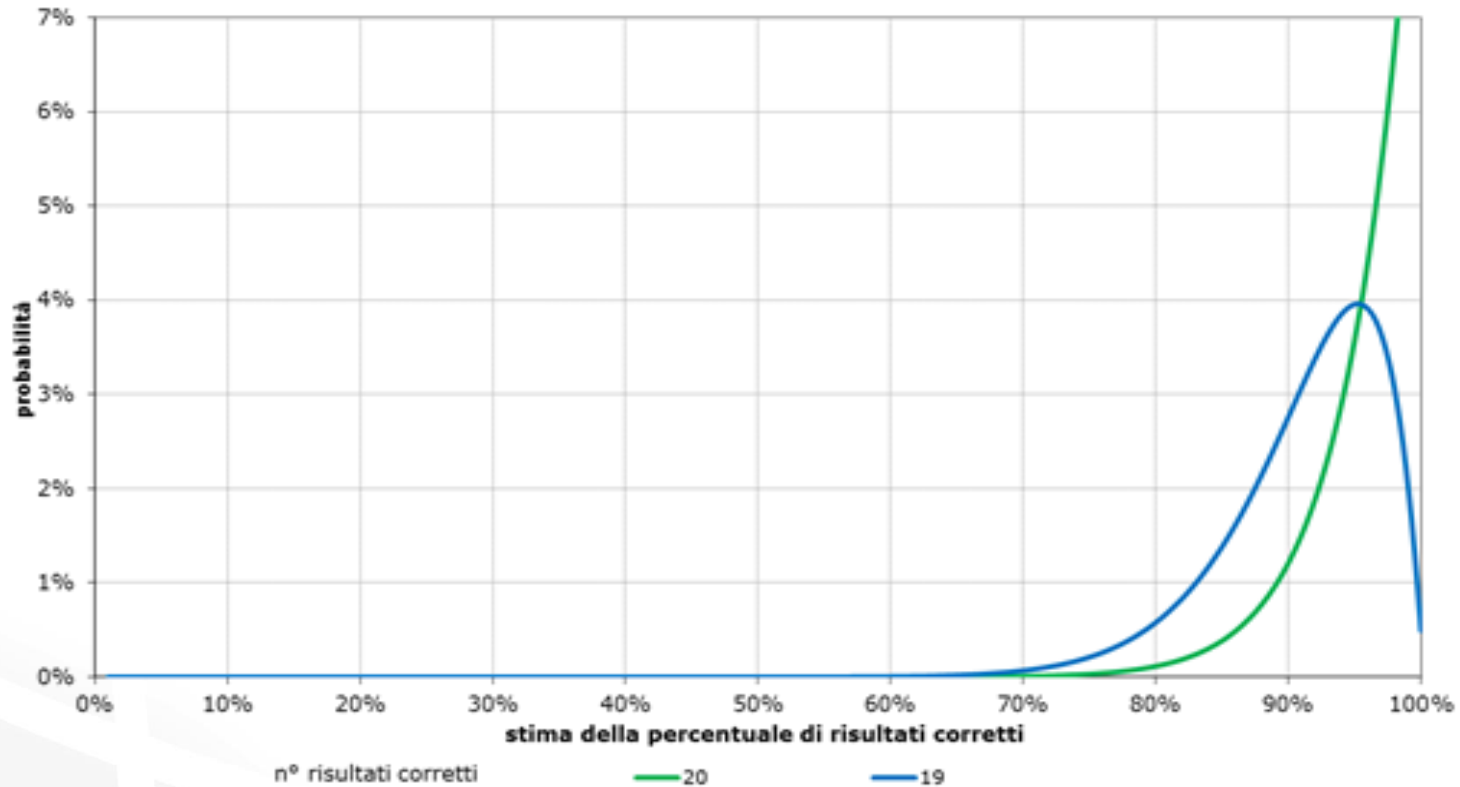
I.c.i. 95%: limite inferiore intervallo di confidenza al 95%

* Entrambi i laboratori hanno riscontrato presenza di coaguli nel campione n° 10




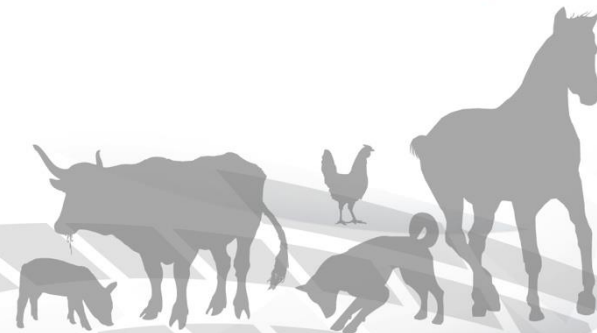
Distribuzioni delle percentuali di risultati corretti Real-time RT-PCR (test qualitativo)

Grafico 18: distribuzioni delle percentuali di risultati corretti Real-time RT-PCR



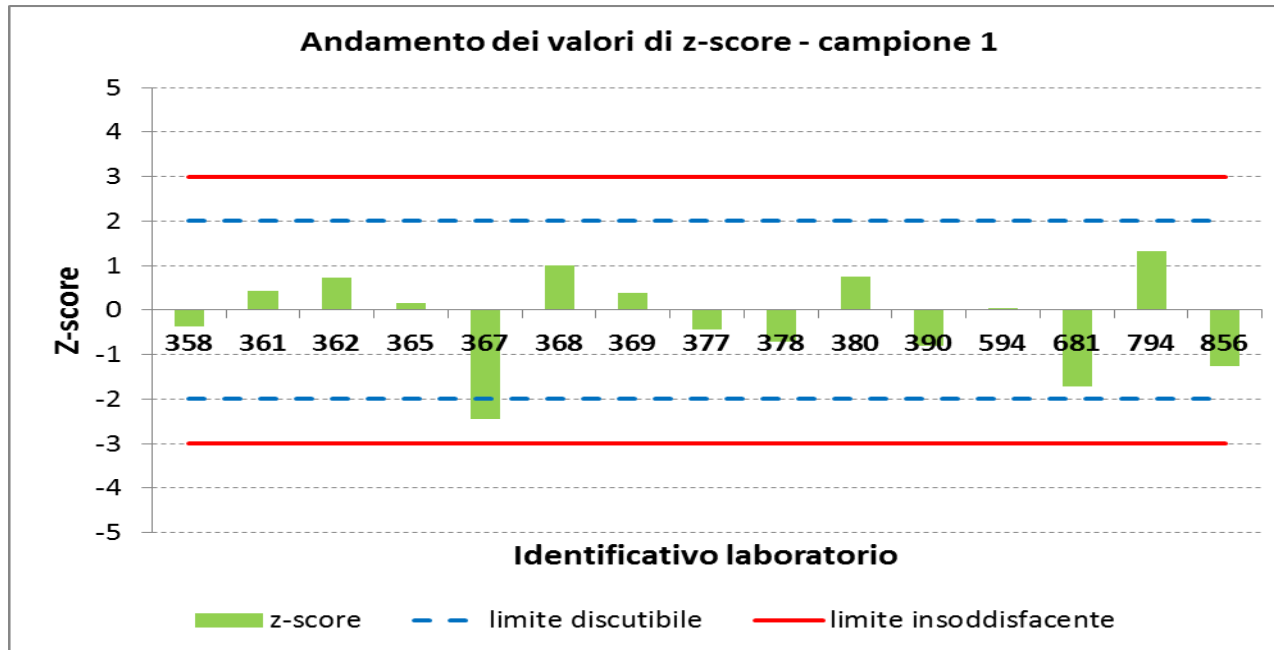
Analisi statistica dei risultati (test quantitativo)

- 
- Calcolo del valore di z-score di ogni singolo campione esaminato, per ogni laboratorio partecipante
 - Valutazione della prestazione globale del laboratorio mediante calcolo di un indice definito dalla somma dei quadrati dei valori di z-score del singolo laboratorio (SQZlab)
 - Verifica della presenza di errori sistematici nei risultati forniti dai laboratori mediante calcolo dell'indice RSZ basato sulla somma degli z-score



Grafici z-score

BTV-1 TCID_{50/ml} 10^{4,9}



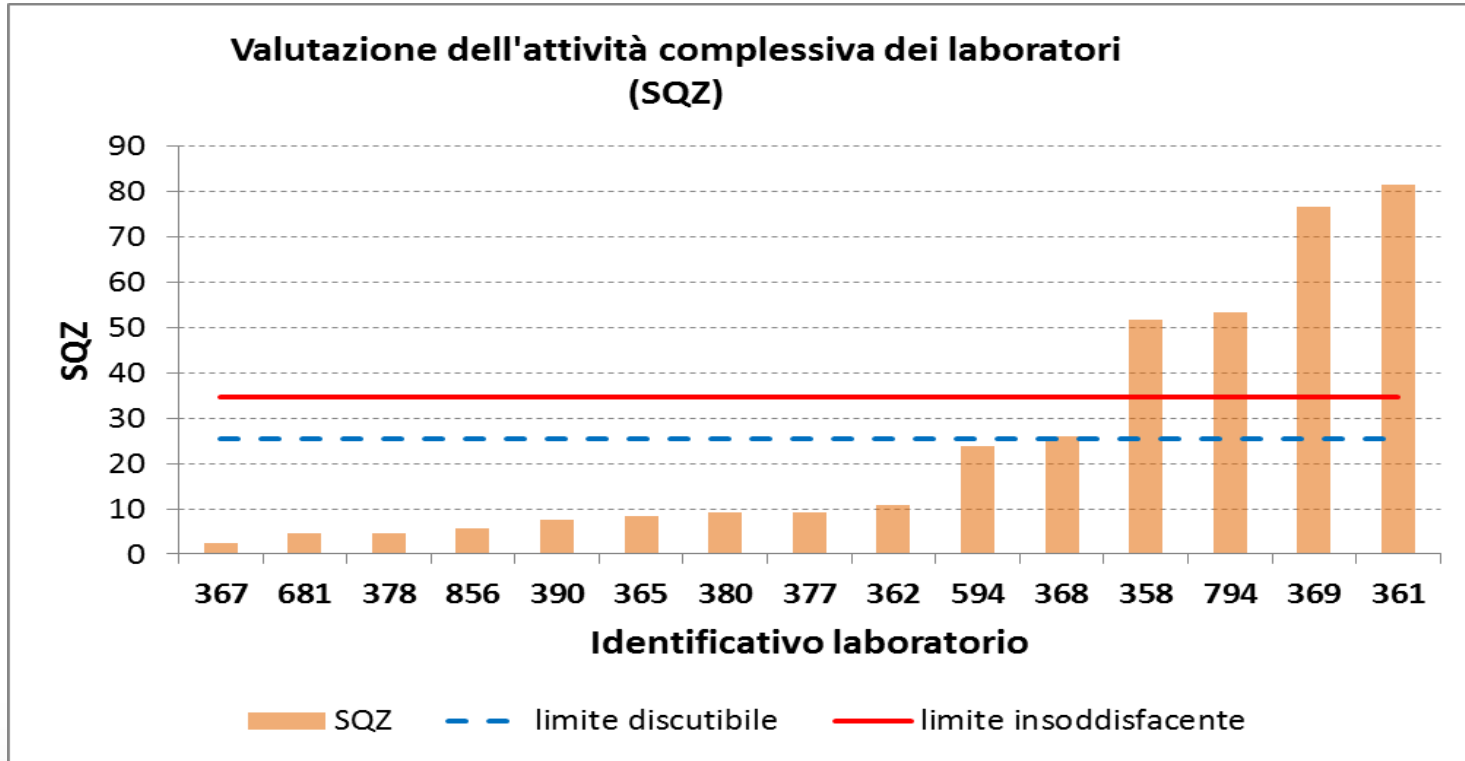
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



Riepilogo dei giudizi relativi ai valori di z-score

Campione	Virus (TCID ₅₀ /ml)	z-score laboratori		
		Soddisfacenti	Discutibili	Insoddisfacenti
1	<i>BTV 1 (10^{4.9})</i>	14	1	
2	<i>BTV 1 (10^{3.9})</i>	13	1	1
3	<i>BTV 1 (10^{2.9})</i>	14	1	
4	<i>BTV 1 (10^{1.9})</i>	15		
5	<i>BTV 1 (10^{0.9})</i>	14	1	
6	<i>BTV 4 (10^{4.8})</i>	13	1	1
7	<i>BTV 4 (10^{3.8})</i>	13	1	1
8	<i>BTV 4 (10^{2.8})</i>	13	2	
9	<i>BTV 4 (10^{1.8})</i>	13	2	
10	<i>BTV 4 (10^{0.8})</i>	12	3	
11	<i>BTV 2 (10^{2.9})</i>	13	1	1
12	<i>BTV 8 (10^{2.9})</i>	14	1	
13	<i>BTV 16 (10^{2.5})</i>	12	2	1
14	<i>BTV 24 (10^{1.6})</i>	15		
15	<i>BTV 26 (10^{1.7})</i>	13	1	1

Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



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

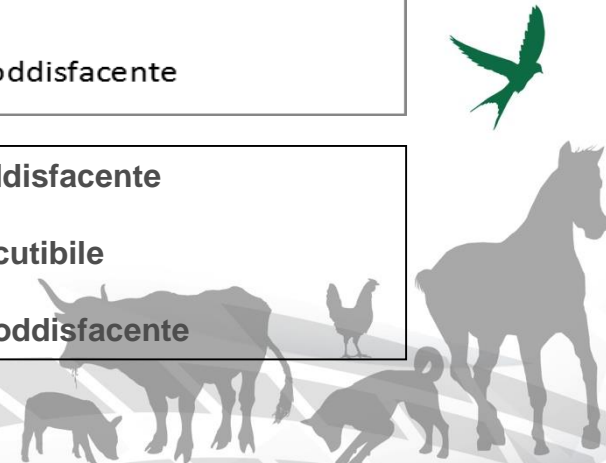
soddisfacente

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

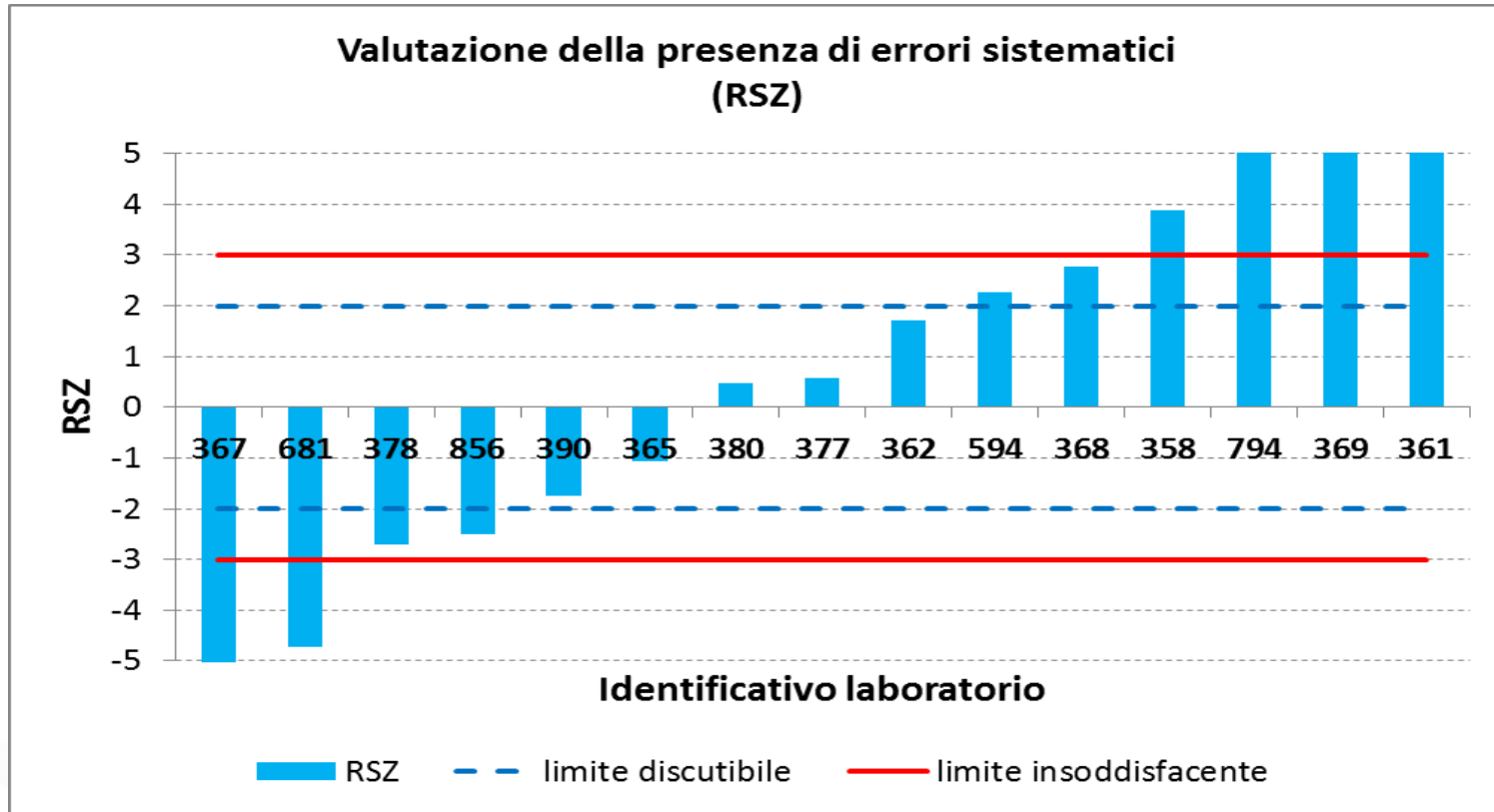
discutibile

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

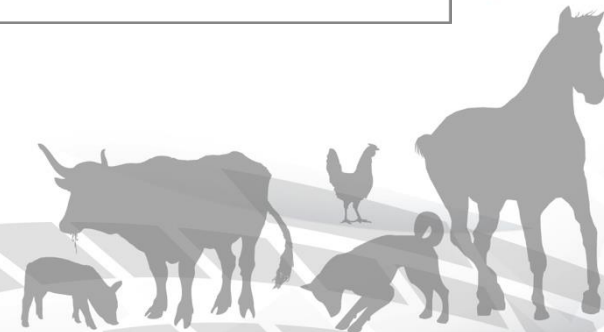
insoddisfacente




Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



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

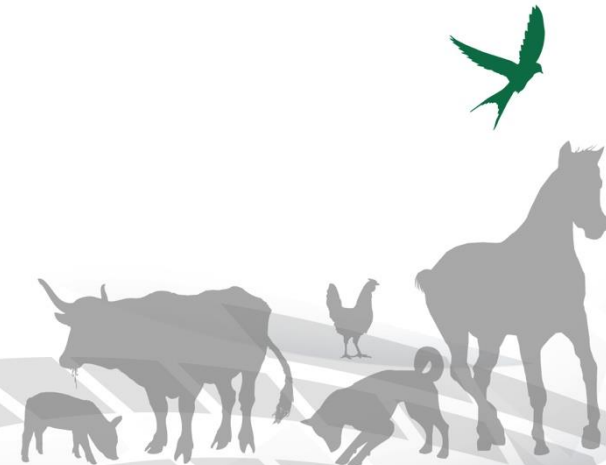


Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)




Prestazione globale (SQZ): soddisfacente per 10 laboratori, discutibile per il laboratorio **368**, insoddisfacente per i laboratori **358, 361, 369, 794**.

- Errori sistematici (RSZ): risultati soddisfacenti per 5 laboratori, discutibili per i laboratori **368, 378, 594, 856**, insoddisfacenti per i laboratori **358, 361, 367, 369, 681, 794**.



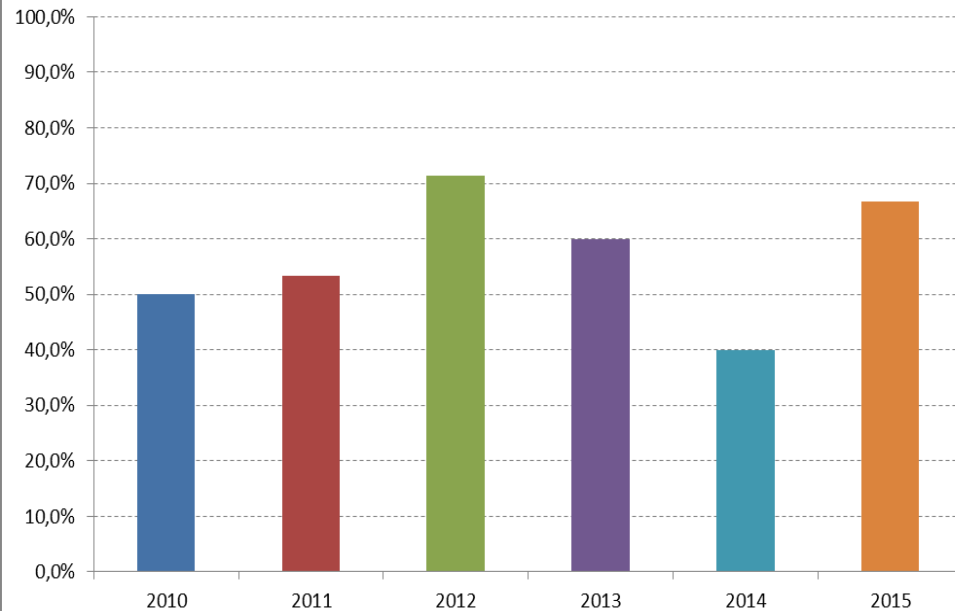
Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ): andamento dal 2010 al 2015

- 
- Andamento negli anni degli indici SQZ e RSZ utilizzando la percentuale di laboratori con giudizio soddisfacente sul totale dei laboratori partecipanti.
 - **SQZ:** tendenza crescente della percentuale dei laboratori con risultati soddisfacenti, fatta eccezione per l'anno 2014.
 - **RSZ:** non si riscontra una tendenza, oscillazione attorno al 25%-30% con lievi scostamenti negli anni.
 - Negli anni sembra migliorata la precisione nell'indicazione del risultato, pur essendo presenti in maniera abbastanza costante problematiche di sottostima e di sovrastima.

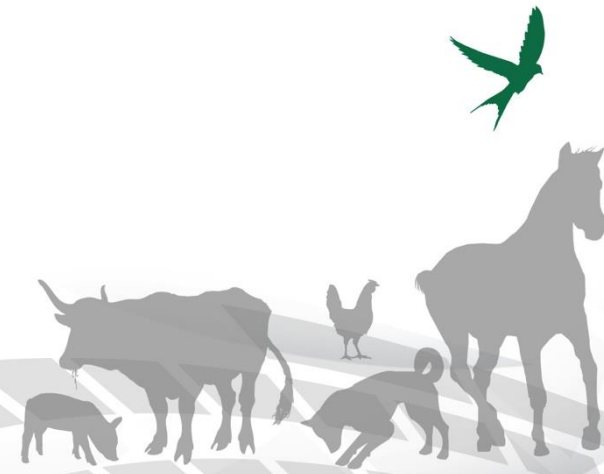


Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ): andamento dal 2010 al 2015

**Percentuale di laboratori con giudizio complessivo
(SQZ) soddisfacente**

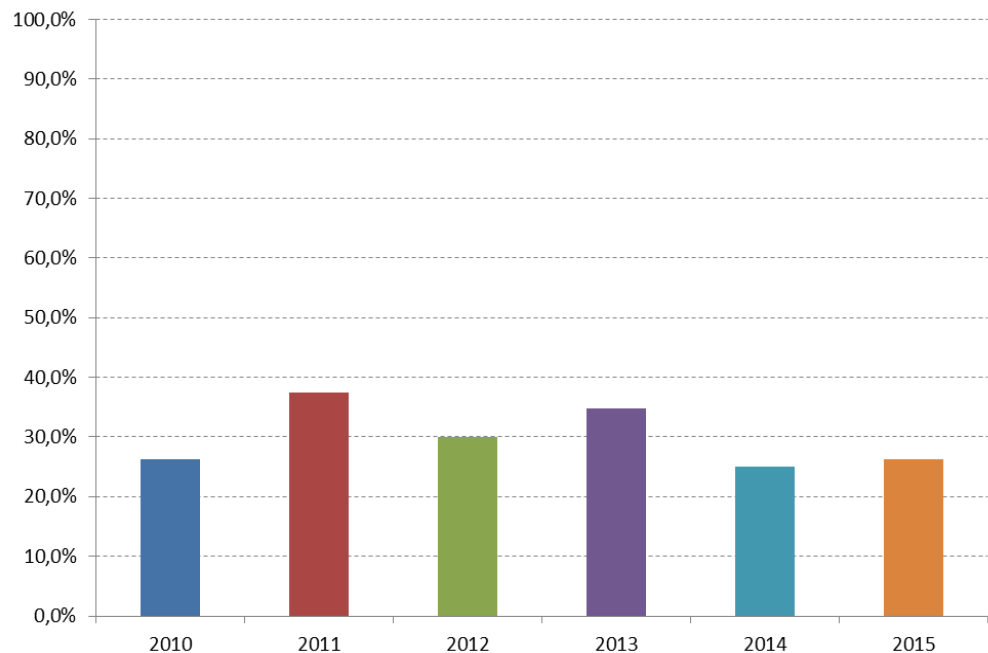


anno	n° laboratori soddisfacenti	n° laboratori partecipanti	% laboratori con giudizio soddisfacente (SQZ)
2010	7	14	50,0%
2011	8	15	53,3%
2012	10	14	71,4%
2013	9	15	60,0%
2014	6	15	40,0%
2015	10	15	66,7%

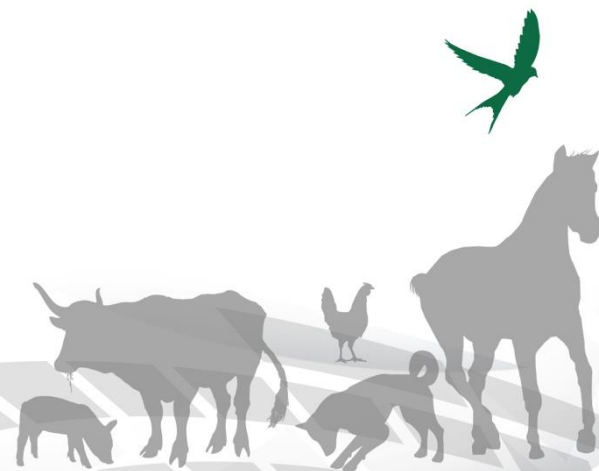


Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ): andamento dal 2010 al 2015

**Percentuale di laboratori con giudizio
soddisfacente degli errori sistematici (RSZ)**



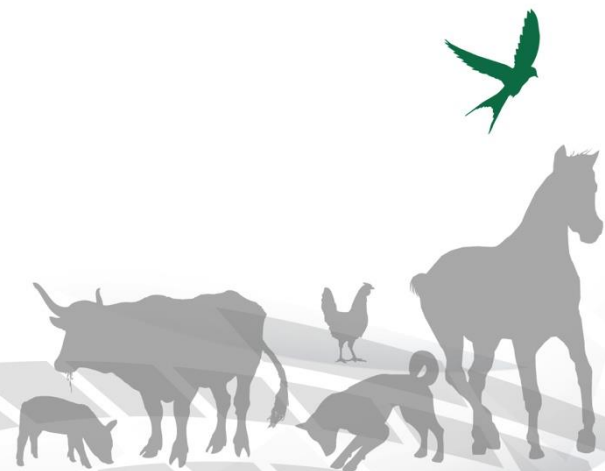
anno	n° laboratori soddisfacenti	n° laboratori partecipanti	% laboratori con giudizio soddisfacente (RSZ)
2010	5	14	26,3%
2011	9	15	37,5%
2012	6	14	30,0%
2013	8	15	34,8%
2014	5	15	25,0%
2015	5	15	25,0%



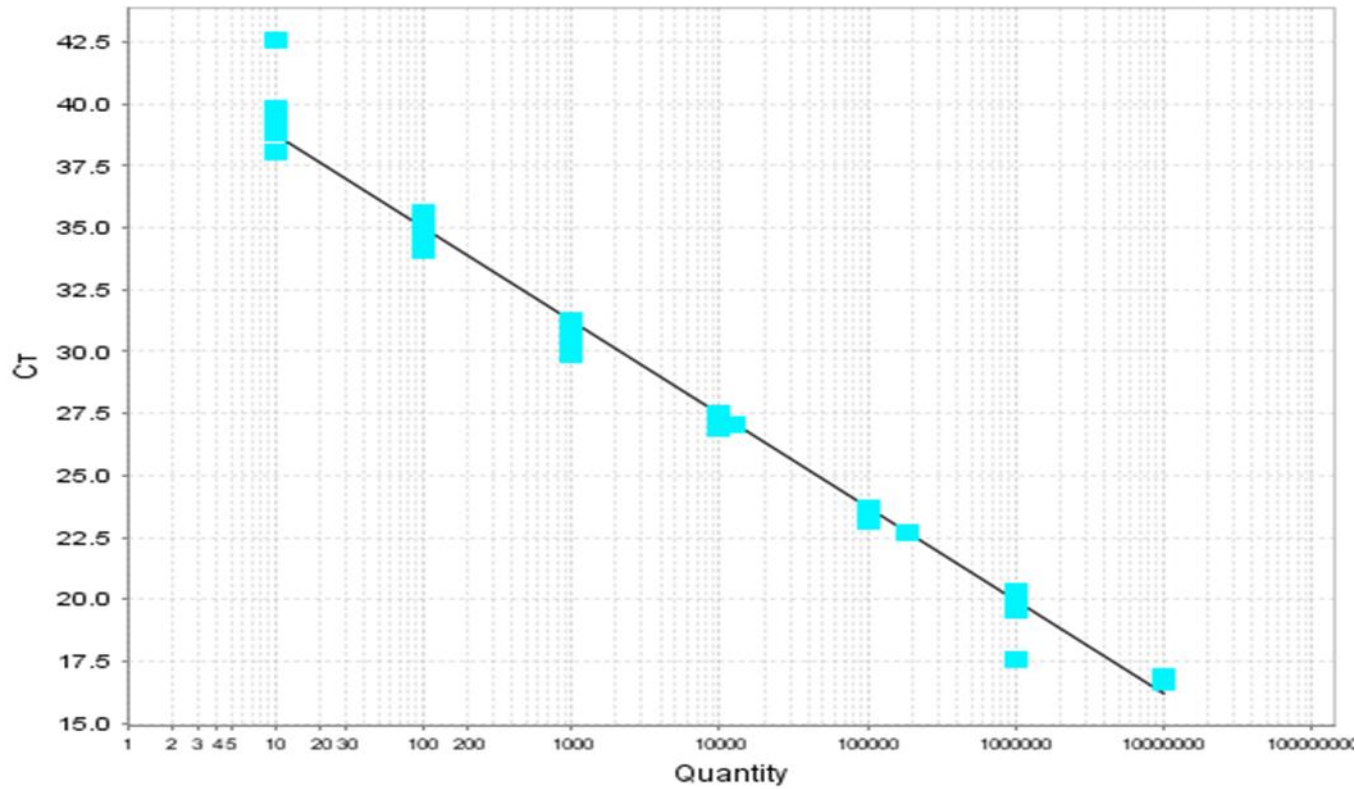


Test quantitativo utilizzando per la costruzione della curva standard plasmide pGEM-T-easy + BTV-NS3

- Plasmide 10^8 copie/ μ l da diluire 10^7 - 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1
- Utilizzare le diluizioni di plasmide per costruire la curva standard su cui stimare il numero di copie virali contenute nei campioni




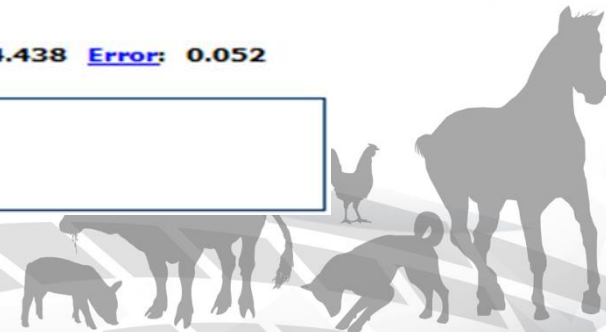
Standard Curve



Target: BTV-NS3 **Slope:** -3.761 **Y-Inter:** 42.512 **R²:** 0.99 **Eff%:** 84.438 **Error:** 0.052

Legend

 BTV-NS3





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Reference Laboratory
Bluetongue

Grazie!!