IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Reference Laboratory
Bluetongue

CIRCUITO INTER-LABORATORIO

RT-PCR BLUETONGUE

DISTRIBUZIONE 1/2017

Ottavio Portanti.
«Giornata di studio sulla Bluetongue», CIFIV, IZS A&M «G. Caporale»
Teramo. 20 Novembre 2018.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Reference Laboratory Bluetongue

Circuito inter-laboratorio RT-PCR Bluetongue: 1/2017

- Undicesimo circuito inter-laboratorio, 17 laboratori partecipanti
- 20 campioni di sangue + pGEM-NS3 (10^8 copie/µl)
- Ogni campione è stato analizzato con metodo Real-time RT-PCR
- Test qualitativo e test quantificazione RNA virale

Campioni infettati con BTV / EHDV

N° campione	Virus/sierotipo	Titolo ($TCID_{50}$/ml)
1	BTV 1	$10^{6,1}$
2	BTV 1	$10^{5,1}$
3	BTV 1	$10^{4,1}$
4	BTV 1	$10^{3,1}$
5	BTV 1	$10^{2,1}$
6	BTV 4	$10^{5,9}$
7	BTV 4	$10^{4,9}$
8	BTV 4	$10^{3,9}$
9	BTV 4	$10^{2,9}$
10	BTV 3	$10^{5,6}$
11	BTV 3	$10^{4,6}$
12	BTV 8	$10^{3,1}$
13	BTV 16	$10^{3,8}$
14	BTV 24	$10^{3,4}$
15	BTV 26	$10^{4,1}$
16	BTV 27	$10^{3,9}$
17	EHDV 7	$10^{6,1}$

Procedure utilizzate

Nome prova	ID laboratorio	Metodo	Procedura	Ente/ditta emittente
Protocollo IZS	**358, 361, 365, 368, 390, 594, 794.**	Real time RT-PCR	IZS TE B2.1.4 SOP118 "Ricerca mediante RT-PCR real time del virus della Bluetongue (sierotipi 1 – 26).	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale" Teramo
Protocollo IZS modificato	**362, 367, 369, 377, 380, 619, 681.**	Real time RT-PCR	IZS TE B2.1.4 SOP118 "Ricerca mediante RT-PCR real time del virus della Bluetongue (sierotipi 1 – 26), con sotituzioni del kit di isolamento acidi nucleici e/o del kit per la preparazione della Master mix.	
Kit commerciale	**378, 390, 594, 873, 874.**	Real time RT-PCR	LSI Vetmax Bluetongue virus NS3 – All genotypes	ThermoFisher Scientific

Test qualitativo: Percentuali di risultati corretti

Id. laboratorio	Campioni correttamente identificati	Campioni esaminati	Stima della percentuale minima di risultati corretti (l.c.i. 95%)
358[a]	20	20	86,7%
361[a]	20	20	86,7%
362[b]	20	20	86,7%
365[a]	20	20	86,7%
367[b]	20	20	86,7%
368[a]	20	20	86,7%
369[b]	20	20	86,7%
377[b]	20	20	86,7%
378[c]	20	20	86,7%
380[b]	20	20	86,7%
390[a]	20	20	86,7%
594[a]	20	20	86,7%
619[b]	20	20	86,7%
681[b]	20	20	86,7%
794[a]	20	20	86,7%
873[c]	20	20	86,7%
874[c]	20	20	86,7%

[a] Protocollo IZS
[b] Protocollo IZS modificato
[c] Kit commerciale

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

OIE Reference Laboratory Bluetongue

Analisi statistica dei risultati (test quantitativo)

- Calcolo del valore di z-score di ogni singolo campione esaminato, per ogni laboratorio partecipante

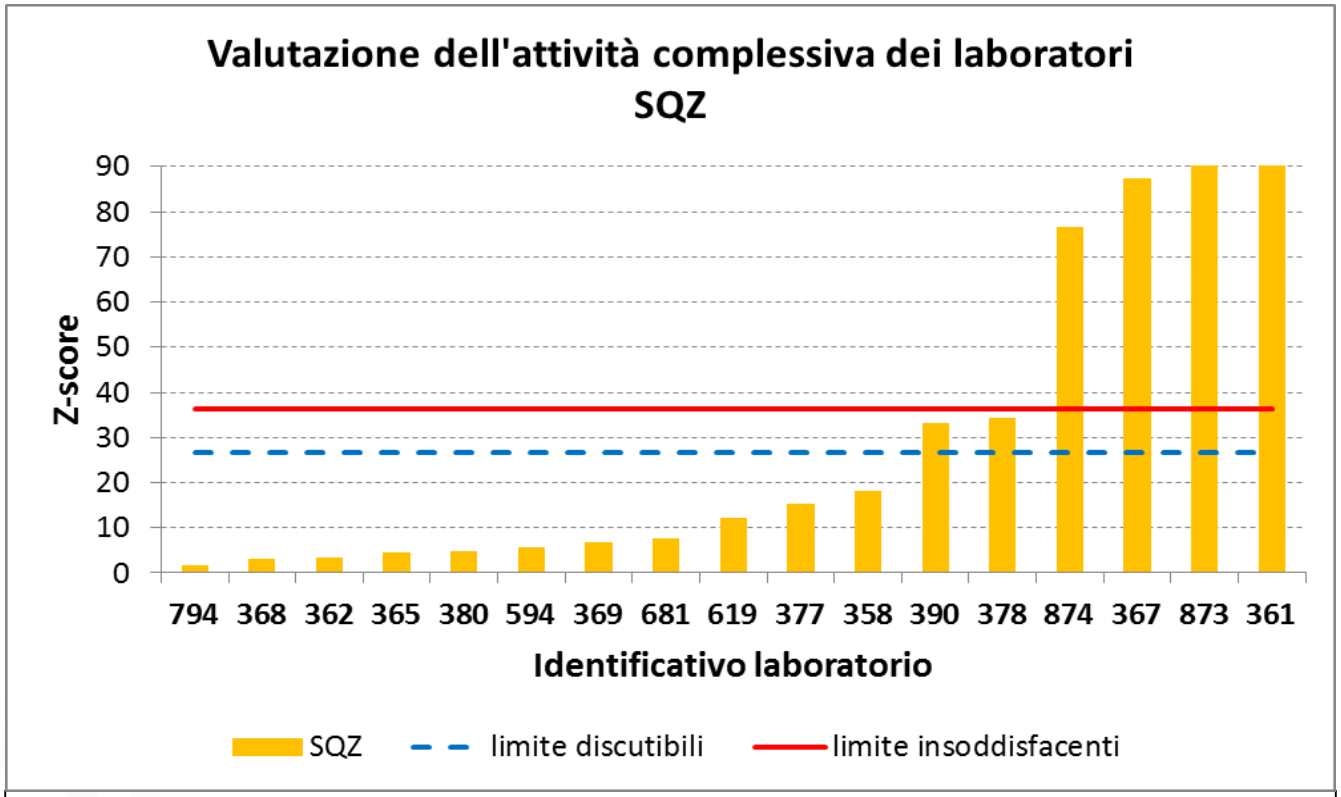
- Valutazione della prestazione globale del laboratorio mediante calcolo di un indice definito dalla somma dei quadrati dei valori di z-score del singolo laboratorio (SQZ)

- Verifica della presenza di errori sistematici nei risultati forniti dai laboratori mediante calcolo dell’indice RSZ basato sulla somma degli z-score

Test quantitativo basato sui Ct: riepilogo dei giudizi relativi ai valori di z-score

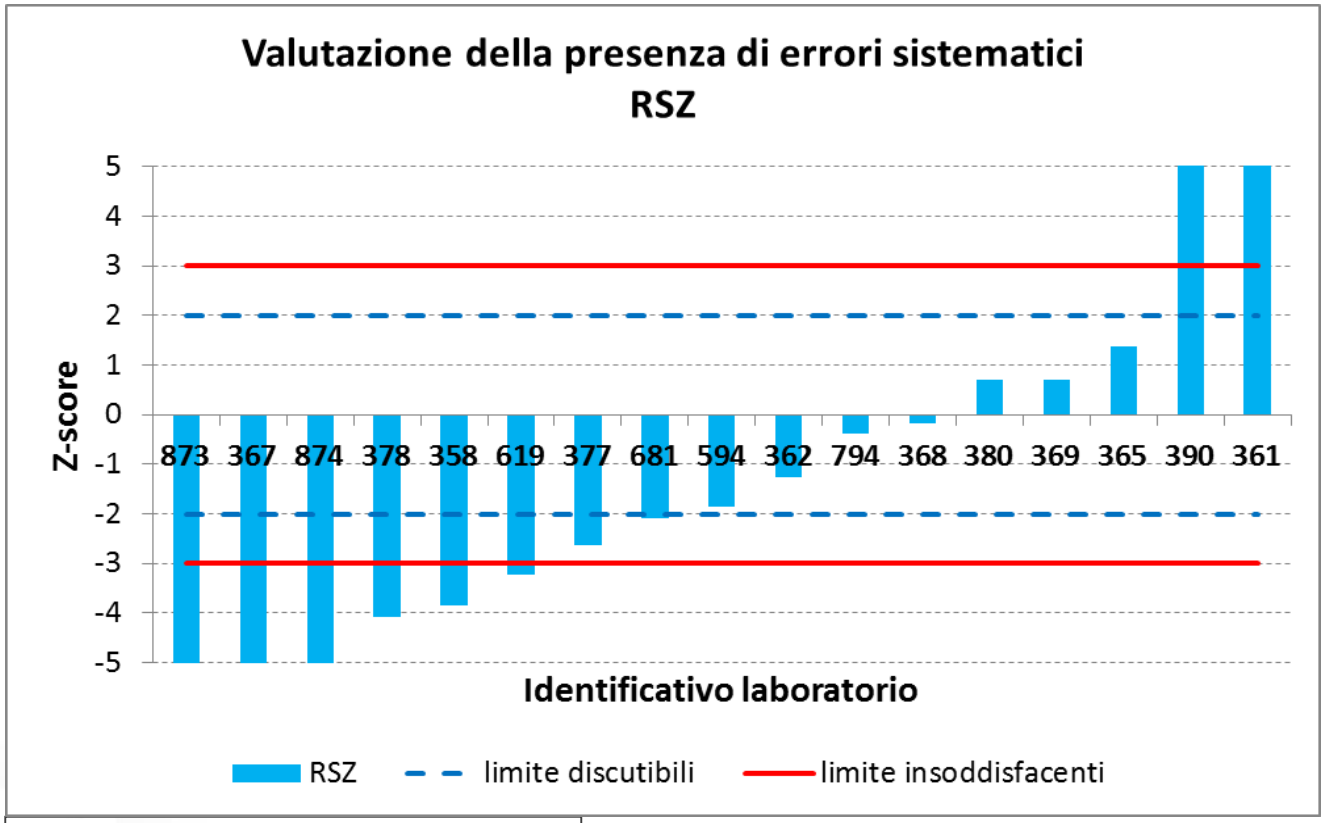
Campione	Virus ($TCID_{50/ml}$)	z-score laboratori		
		Soddisfacenti	Discutibili	Insoddisfacenti
1	*BTV 1 ($10^{6,1}$)*	14	2	1
2	*BTV 1 ($10^{5,1}$)*	12	4	1
3	*BTV 1 ($10^{4,1}$)*	14	3	
4	*BTV 1 ($10^{3,1}$)*	13	4	
5	*BTV 1 ($10^{2,1}$)*	14	3	
6	*BTV 4 ($10^{5,9}$)*	16		1
7	*BTV 4 ($10^{4,9}$)*	16	1	
8	*BTV 4 ($10^{3,9}$)*	13	4	
9	*BTV 4 ($10^{2,9}$)*	11	3	3
10	*BTV 3 ($10^{5,6}$)*	15	1	1
11	*BTV 3 ($10^{4,6}$)*	13	4	
12	*BTV 8 ($10^{3,1}$)*	13	3	1
13	*BTV 16 ($10^{3,8}$)*	16	1	
14	*BTV 24 ($10^{3,4}$)*	13	3	1
15	*BTV 26 ($10^{4,1}$)*	15	2	
16	*BTV 27 ($10^{3,9}$)*	15	2	

Test quantitativo basato sui Ct: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



$SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0455; n)	**soddisfacente**
SQZ (α = 0,0455; n) $\leq SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0027; n)	**discutibile**
$SQZ_{lab} \geq SQZ$ (α = 0,0027; n)	**insoddisfacente**

Test quantitativo basato sui Ct: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



|RSZ| ≤ 2	soddisfacente
2 < |RSZ| < 3	discutibile
|RSZ| ≥ 3	insoddisfacente

Test quantitativo basato sui Ct:
Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)

- Prestazione globale (SQZ): soddisfacente per 11 laboratori, discutibile per il laboratorio **390,** insoddisfacente per i laboratori **361**, **367**, **378**, **873** e **874.**

- Errori sistematici (RSZ): risultati soddisfacenti per 7 laboratori, discutibili per i laboratori **377** e **681,** insoddisfacenti per i laboratori **358**, **361**, **367**, **378**, **390**, **619**, **873** e **874**.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

OIE Reference Laboratory Bluetongue

Test di quantificazione RNA virale

- Plasmide pGEM-T-easy vector + BTV1-Seg.10 (ds DNA, pGEM-NS3)
- Plasmide 10^8 copie/µl : range linearità 10^7-10^1 copie/µl
- Risultati: copie virali/µl sangue
- Procedure : Protocollo IZS, Protocollo IZS modificato, Kit commerciale
- Laboratori **390** e **594** risultati ottenuti con Protocollo IZS e Kit commerciale

Stime del numero di copie virali per microlitro di sangue

	ID LABORATORI																	
N° CAMPIONE	358[a]	361[a]	362[b]	365[a]	367[b]	368[a]	369[b]	377[b]	378[c]	380[b]	390[c]	390[a]	619[b]	594[c]	594[a]	681[b]	794[a]	874[c]
1	32585,7	700	21600	651,65	765	136,34	7061	9472	19990	1442	6434,35	42176,5	34300	3890	52900	1010	6800,26	2890
2	2036,5	18,25	2693	33,45	63	11,38	949,88	605,25	3633	24	1068,96	5444,04	697	281	3080	503	458,64	48
3	462,2	30,45	277	2,67	7	1,07	105,2	67,05	160	23	118,39	334,93	223	25,3	274	89,8	41,354	6,33
4	39,9	0,1285	32	0,13	1	0,16	48,7	6,71	28	0,23	14,08	4,89	51	1,5	17,9	4,97	1,092	0,451
5	6,6	0,33655	3	0,06	0,12	0,025	7,4	1,21	3	0,05	1,27	0,94	5,4	27,9	5,05	1,17	3,49	0,013
6	6500,5	14,1	8160	87,24	100	20,26	2203	4854	9532	465	3310,56	6762,61	7650	775	29700	5400	1922,2	326
7	294,3	29,9	747	6,57	20	2,168	165,5	470	761	48	192,11	587,88	944	50,4	800	465	179,421	7,51
8	51,6	6	65	0,21	3	0,43	17,2	35,43	29	4,2	24,01	31,94	106	4,14	36,1	47,8	21,98	1,72
9	5,1	0,00171	9	0,06	0,3	0,065	14,91	4,68	6	0,34	2,18	0,85	21	0,36	8,67	4	1,2845	0,0684
10	20749,3	7850	58667	406,42	5,25	92,88	9760	12622	20967	1752	2931,45	20973,6	10230	1860	22300	12900	4313,73	670
11	880,7	17,1	1040	30,06	50	6,94	1013	1194,75	2756	120	509,42	819,47	2055	193	2240	1190	179,664	45
12	7	0,00576	11	0,1	0,3	0,044	33,6	6	9	0,77	2,45	4,29	20	0,346	6,34	4,87	1,245	0,062
13	104,9	0,3245	40	0,34	1	0,15	23,7	44,66	76	6,7	17,98	41,09	105	3,65	33,9	14,2	5,927	1,06
14	275,9	0,745	827	3,36	22	2,14	228,7	260	894	50	100,12	1089,4	697	17,4	672	308	55,73	15
15	135,8	11,15	88	1,65	3	0,14	58,8	96,07	168	33	57,71	34,63	310	8,1	156	92,1	16,731	3,3
16	199,9	27,95	109	1,49	3	0,65	112,3	111,9	426	29	127,33	105,91	175	26,9	131	124	17,83	5,04
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

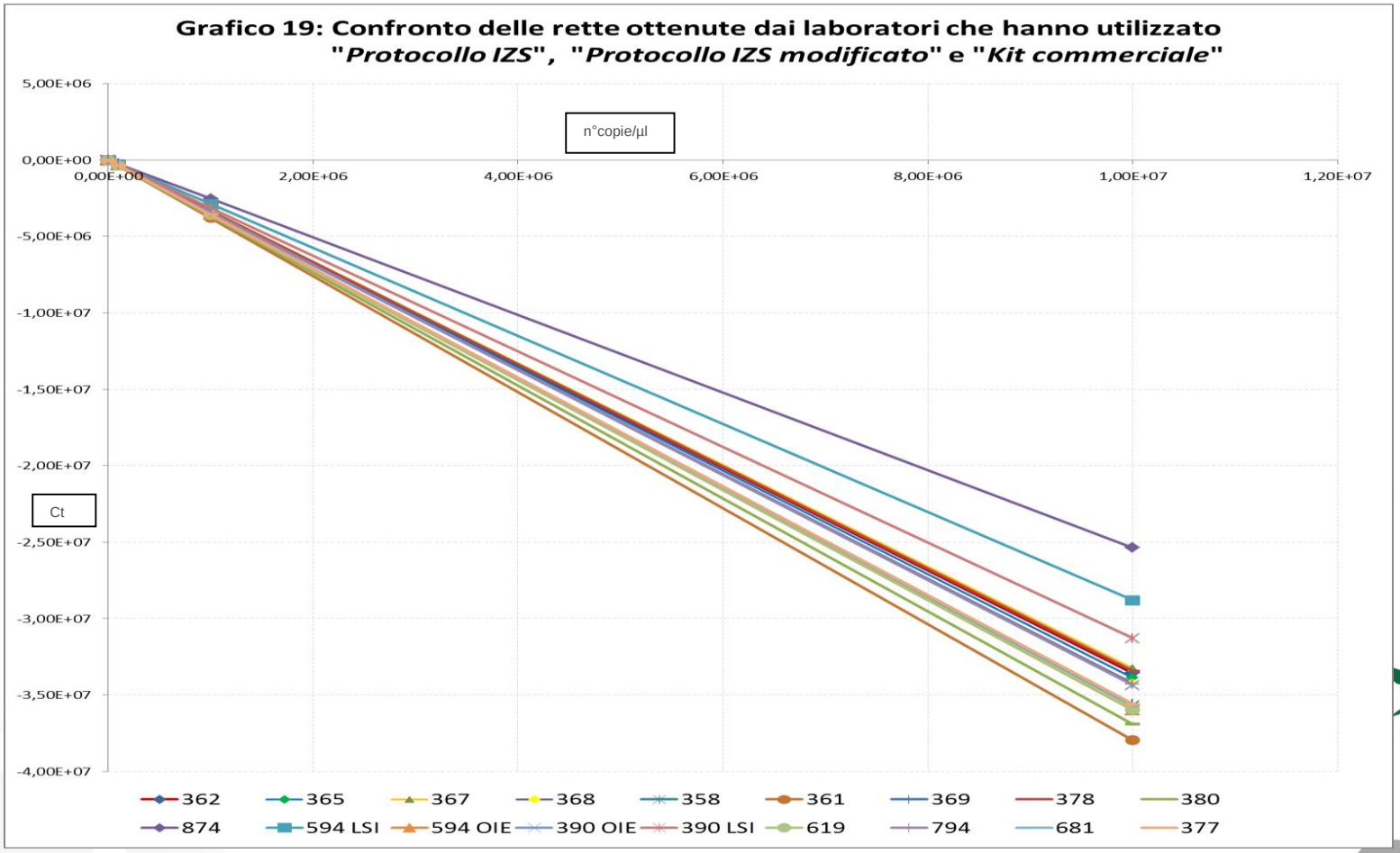
[a] *Protocollo IZS*; [b] *Protocollo IZS modificato*; [c] *Kit commerciale*.

Caratteristiche delle rette di riferimento ottenute dai laboratori

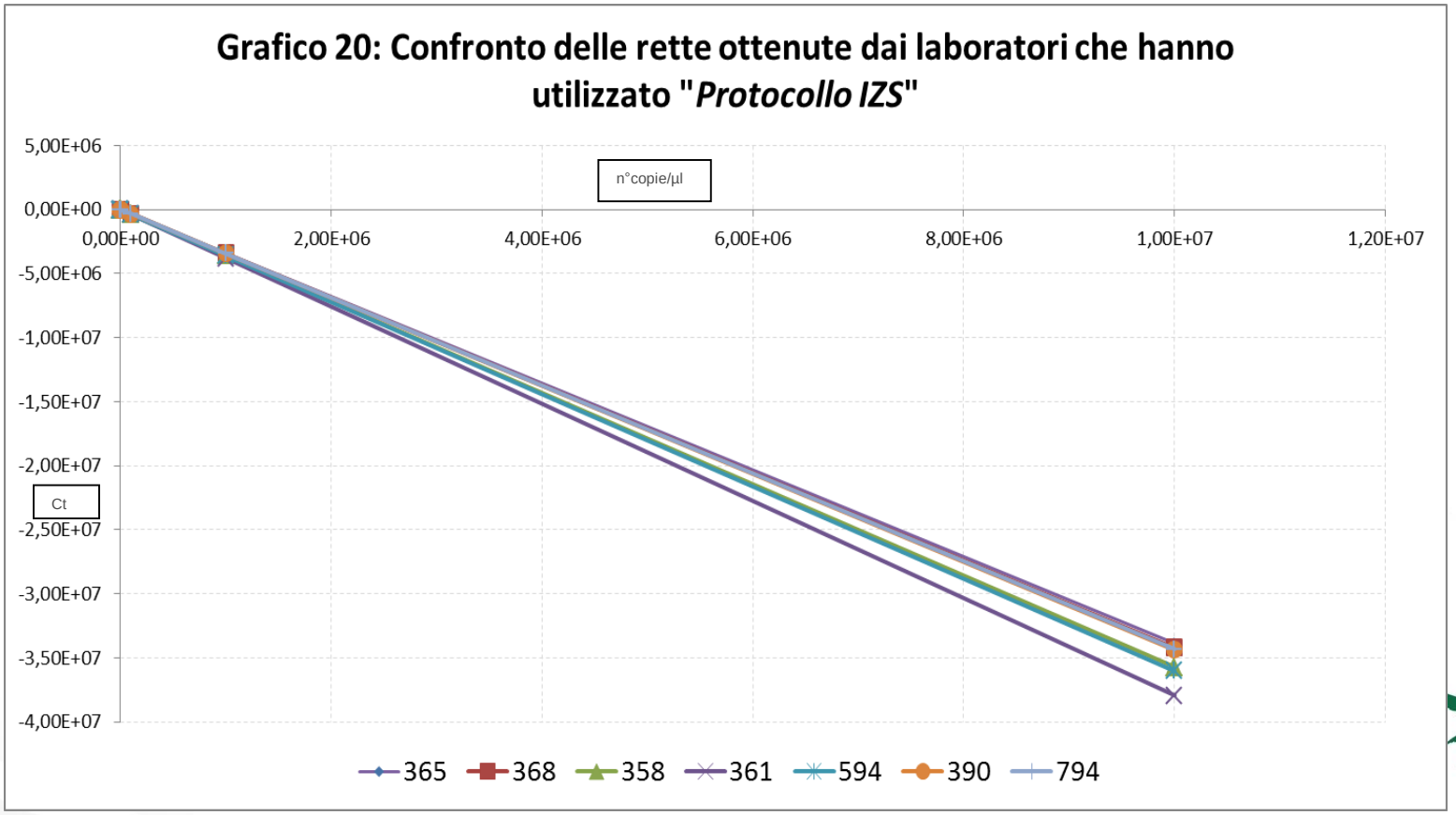
	ID LABORATORI																	
	362[b]	365[a]	367[b]	368[a]	358[a]	361[a]	369[b]	378[c]	380[b]	874[c]	594[c]	594[a]	390[a]	390[c]	619[b]	794[a]	681[b]	377[b]
Slope:	-3,357	-3,386	-3,326	-3,420	-3,571	-3,796	-3,558	-3,343	-3,690	-2,537	-2,880	-3,600	-3,437	-3,130	-3,596	-3,431	-3,569	-3,560
Y-inter:	37,312	37,631	31,226	35,623	42,562	42,288	42,006	37,650	38,328	33,446	36,181	43,397	45,494	38,564	41,169	41,635	39,894	39,950
R2:	1,000	0,999	0,999	1,000	0,999	0,995	0,991	0,996	0,999	0,987	0,984	0,989	0,995	0,997	0,997	0,980	0,990	0,990
Eff.%:	98,6	97,4	99,8	96,1	90,6	83,4	91,0	99,1	86,6	147,8	122,0	90,0	95,4	108,7	89,7	95,6	90,6	91,0

[a] *Protocollo IZS*; [b] *Protocollo IZS modificato*; [c] *Kit commerciale.*

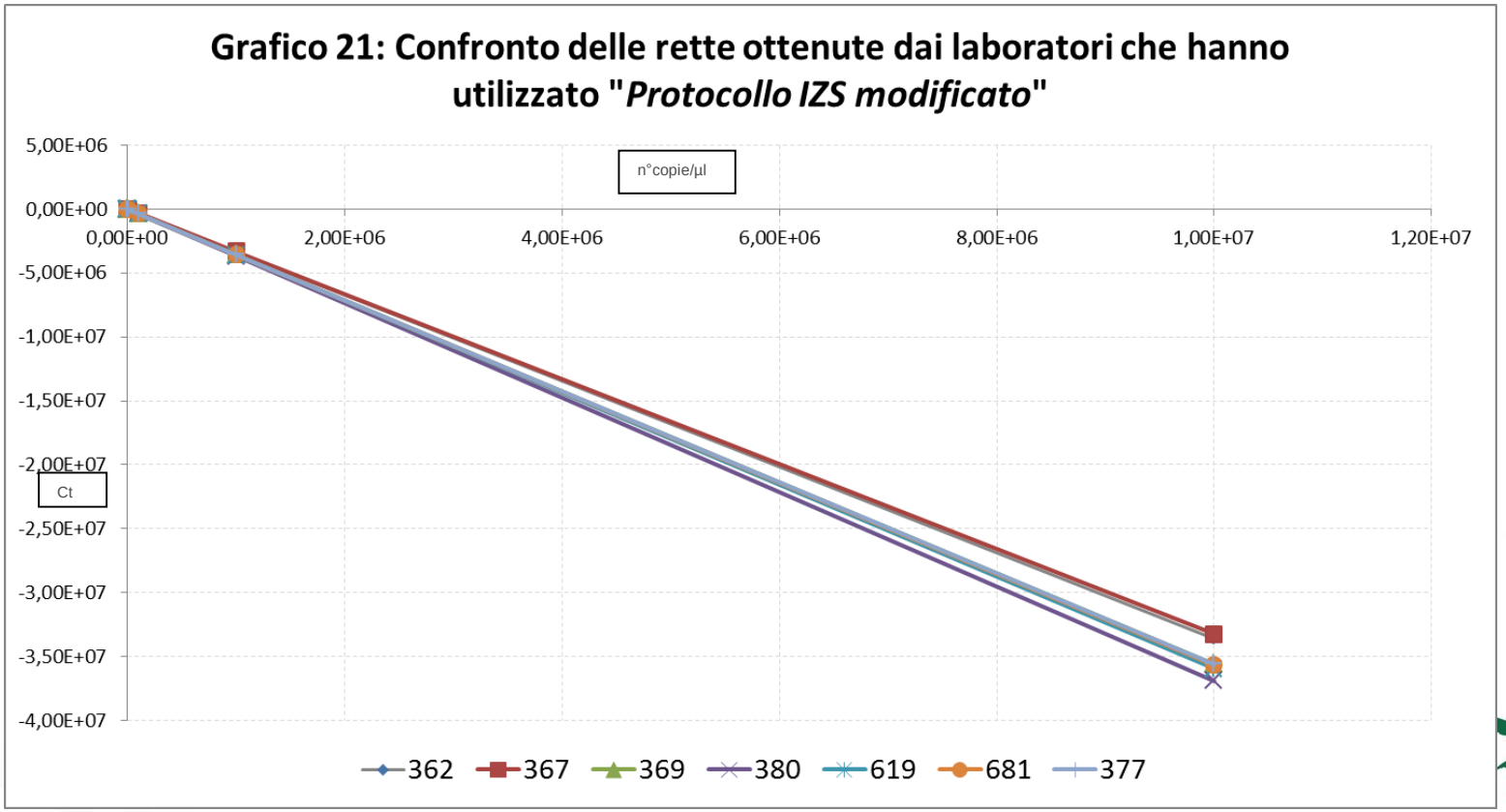
Confronto rette di riferimento



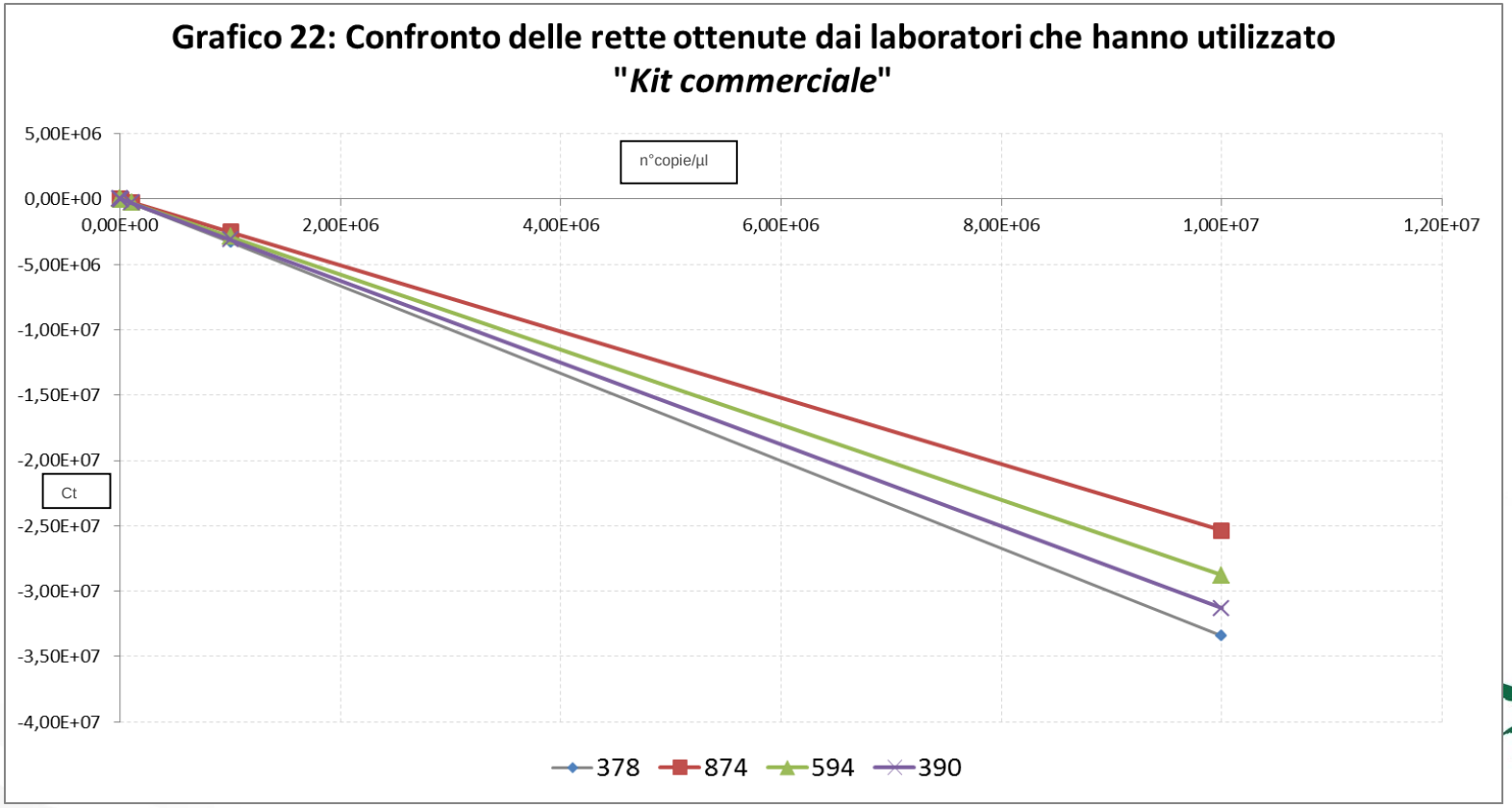
Confronto rette di riferimento



Confronto rette di riferimento



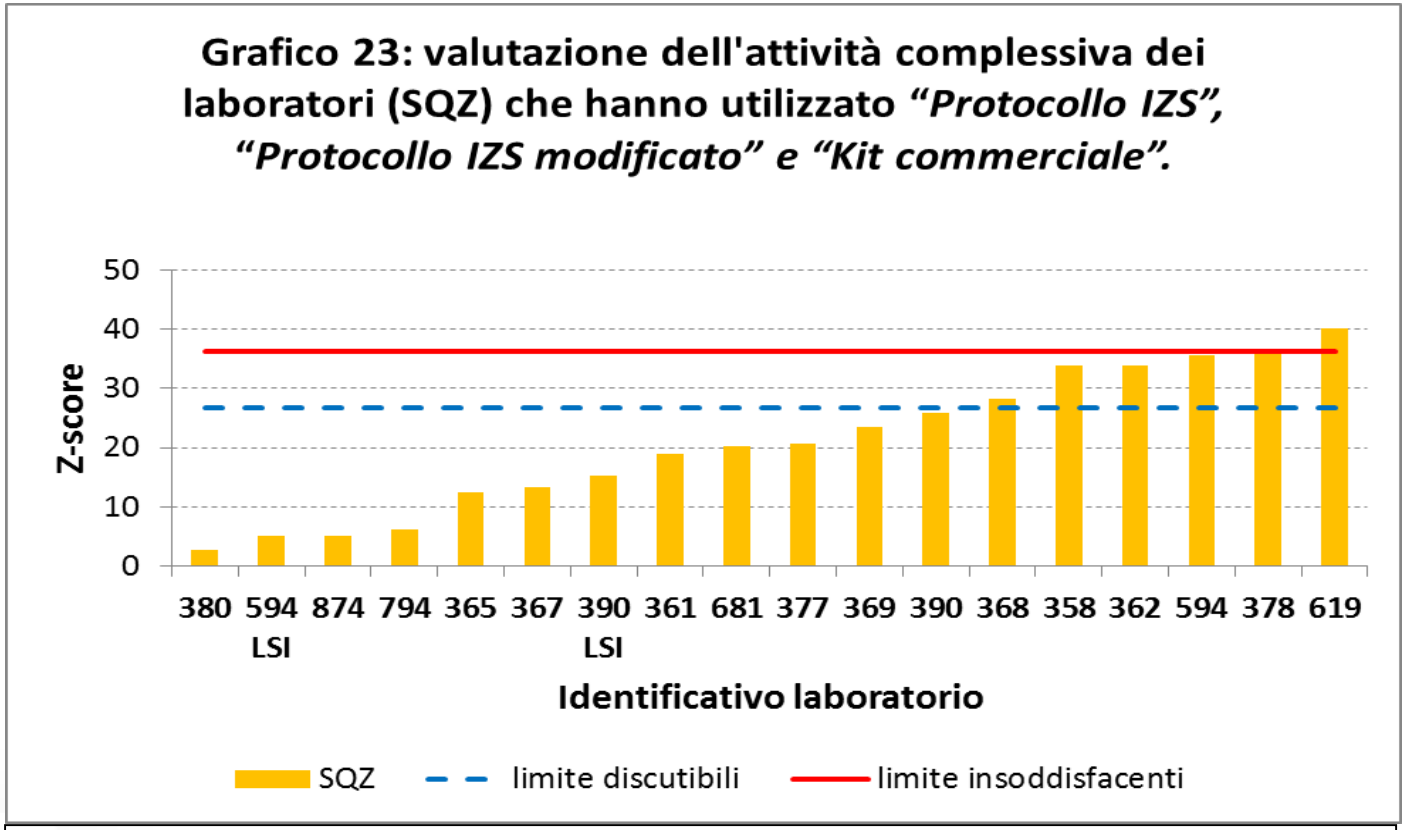
Confronto rette di riferimento



Test quantitativo basato sul numero copie virali: riepilogo dei giudizi relativi ai valori di z-score – Protocollo IZS, Protocollo IZS modificato e Kit commerciale

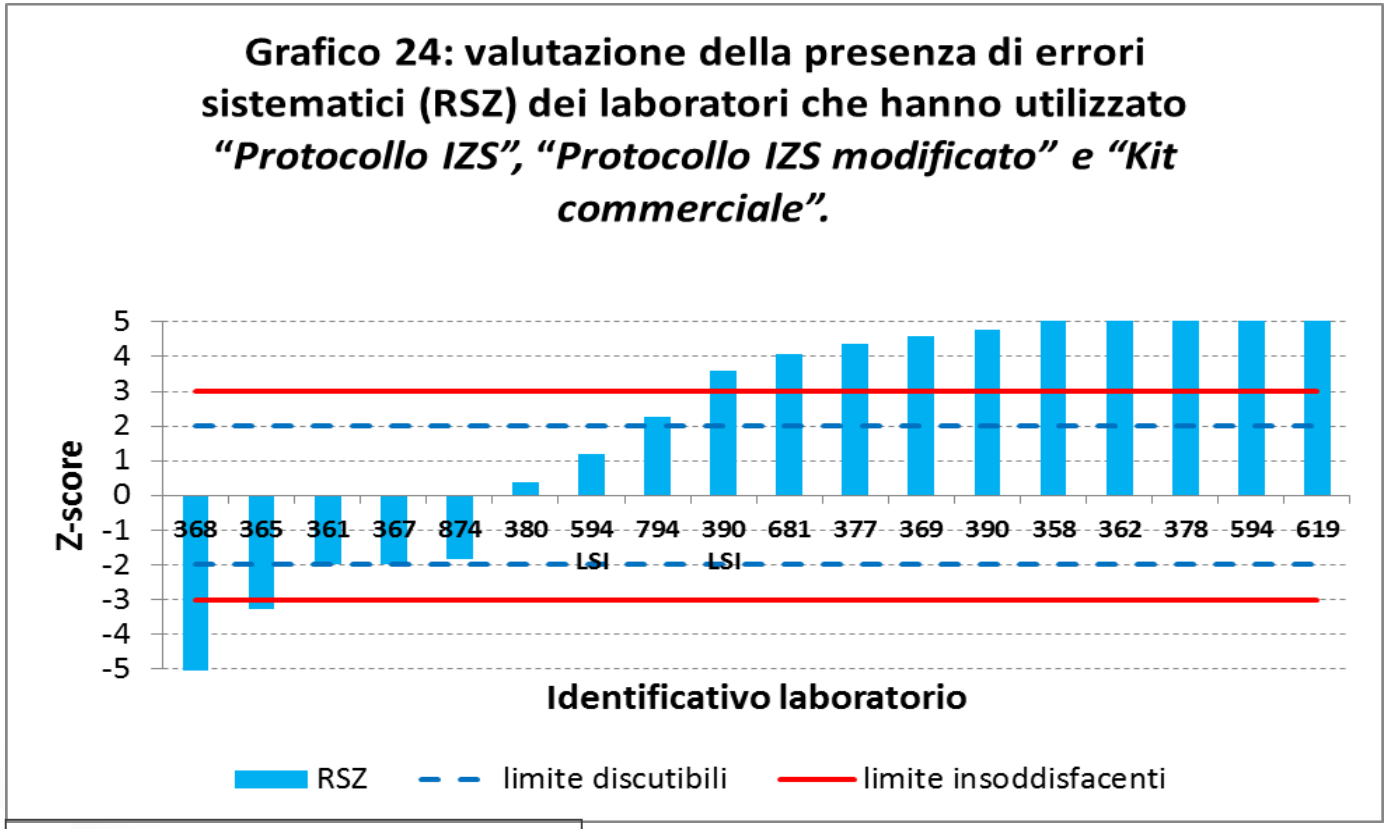
Campione	Virus ($TCID_{50/ml}$)	z-score laboratori		
		Soddisfacenti	Discutibili	Insoddisfacenti
1	*BTV 1 ($10^{6,1}$)*	18		
2	*BTV 1 ($10^{5,1}$)*	18		
3	*BTV 1 ($10^{4,1}$)*	18		
4	*BTV 1 ($10^{3,1}$)*	17	1	
5	*BTV 1 ($10^{2,1}$)*	18		
6	*BTV 4 ($10^{5,9}$)*	18		
7	*BTV 4 ($10^{4,9}$)*	18		
8	*BTV 4 ($10^{3,9}$)*	17	1	
9	*BTV 4 ($10^{2,9}$)*	17	1	
10	*BTV 3 ($10^{5,6}$)*	17	1	
11	*BTV 3 ($10^{4,6}$)*	18		
12	*BTV 8 ($10^{3,1}$)*	18		
13	*BTV 16 ($10^{3,8}$)*	18		
14	*BTV 24 ($10^{3,4}$)*	18		
15	*BTV 26 ($10^{4,1}$)*	16	2	
16	*BTV 27 ($10^{3,9}$)*	15	3	

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



$SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0455; n)	soddisfacente
SQZ (α = 0,0455; n) $\leq SQZ_{lab} \leq$ SQZ (α = 0,0027; n)	discutibile
$SQZ_{lab} \geq SQZ$ (α = 0,0027; n)	insoddisfacente

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



|RSZ| ≤ 2	soddisfacente
2 < |RSZ| < 3	discutibile
|RSZ| ≥ 3	insoddisfacente

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)

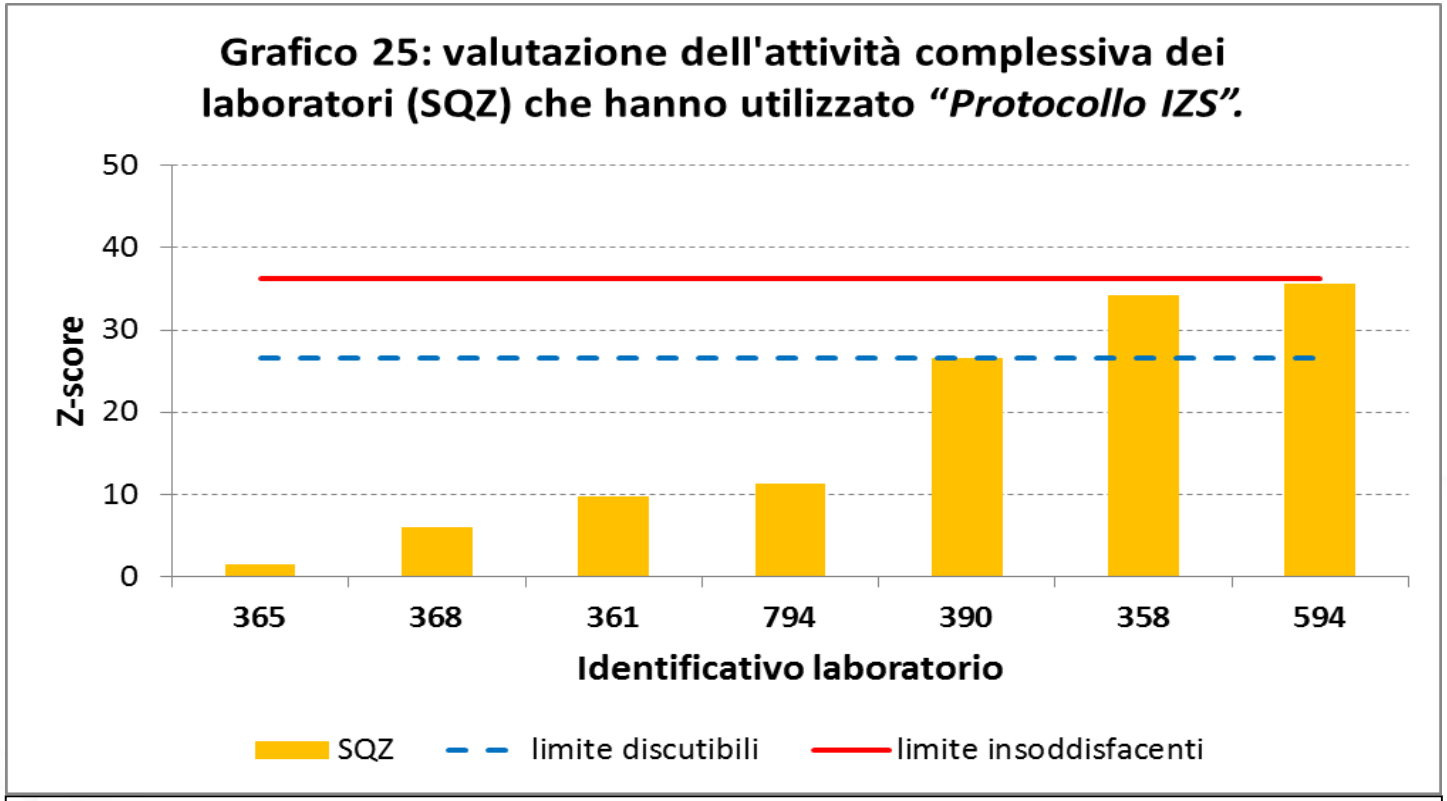
- Prestazione globale (SQZ): soddisfacente per 12 laboratori, discutibile per i laboratori **358, 362, 368, 378, 594** insoddisfacente per il laboratorio **619.**

- Errori sistematici (RSZ): risultati soddisfacenti per 5 laboratori, discutibili per il laboratori **794,** insoddisfacenti per i laboratori **358**, **362**, **365**, **368**, **369**, **377**, **378**, **390**, **390 LSI**, **594**, **619** e **681**.

Test quantitativo basato sul numero copie virali: riepilogo dei giudizi relativi ai valori di z-score – Protocollo IZS.

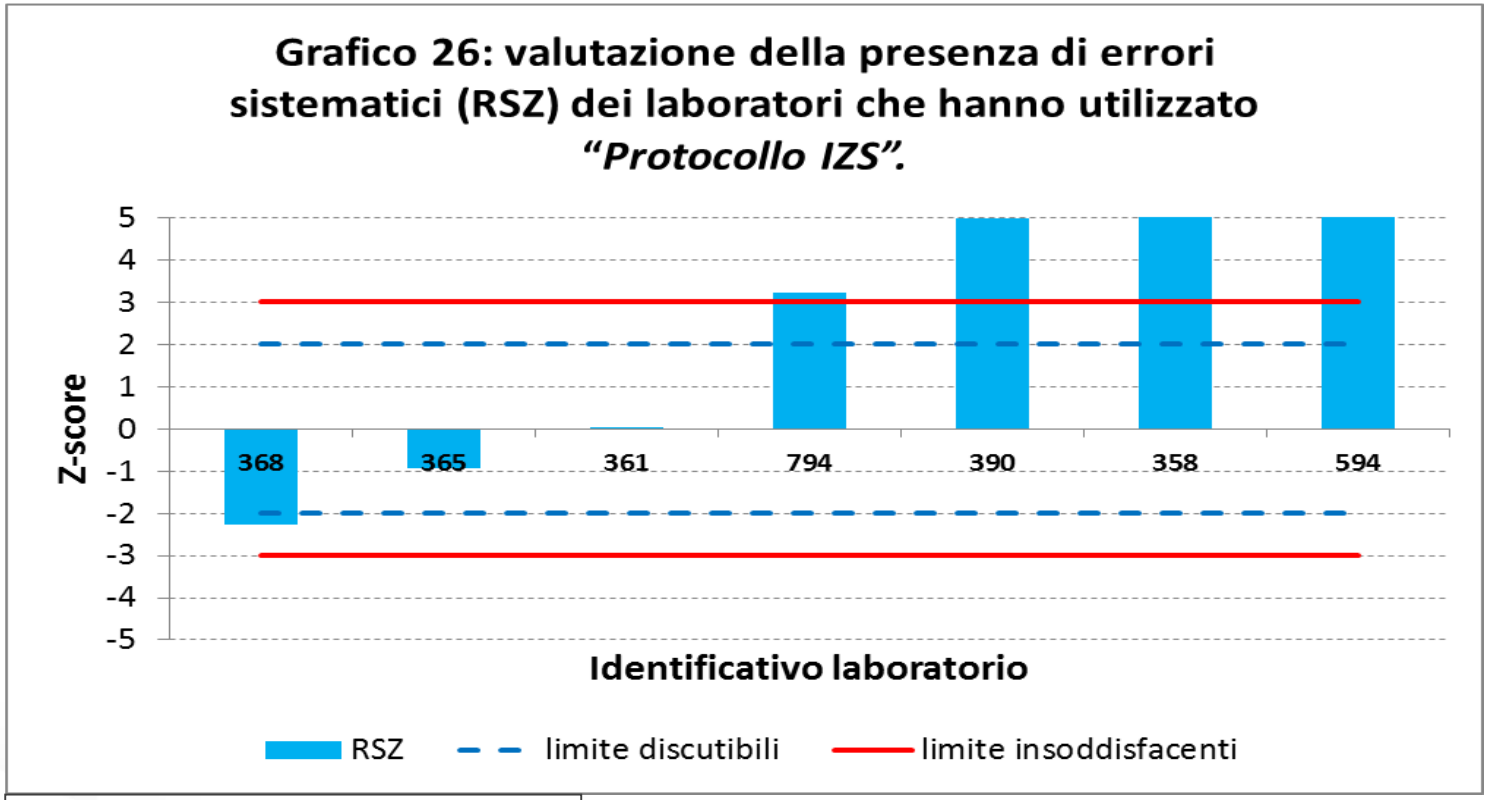
Campione	Virus ($TCID_{50/ml}$)	z-score laboratori		
		Soddisfacenti	Discutibili	Insoddisfacenti
1	*BTV 1 ($10^{6,1}$)*	7		
2	*BTV 1 ($10^{5,1}$)*	7		
3	*BTV 1 ($10^{4,1}$)*	7		
4	*BTV 1 ($10^{3,1}$)*	7		
5	*BTV 1 ($10^{2,1}$)*	7		
6	*BTV 4 ($10^{5,9}$)*	7		
7	*BTV 4 ($10^{4,9}$)*	7		
8	*BTV 4 ($10^{3,9}$)*	7		
9	*BTV 4 ($10^{2,9}$)*	7		
10	*BTV 3 ($10^{5,6}$)*	7		
11	*BTV 3 ($10^{4,6}$)*	7		
12	*BTV 8 ($10^{3,1}$)*	7		
13	*BTV 16 ($10^{3,8}$)*	7		
14	*BTV 24 ($10^{3,4}$)*	7		
15	*BTV 26 ($10^{4,1}$)*	5	2	
16	*BTV 27 ($10^{3,9}$)*	7		

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



$SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0455; n)	**soddisfacente**
SQZ (α = 0,0455; n) $\leq SQZ_{lab} \leq$ SQZ (α = 0,0027; n)	**discutibile**
$SQZ_{lab} \geq SQZ$ (α = 0,0027; n)	**insoddisfacente**

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)

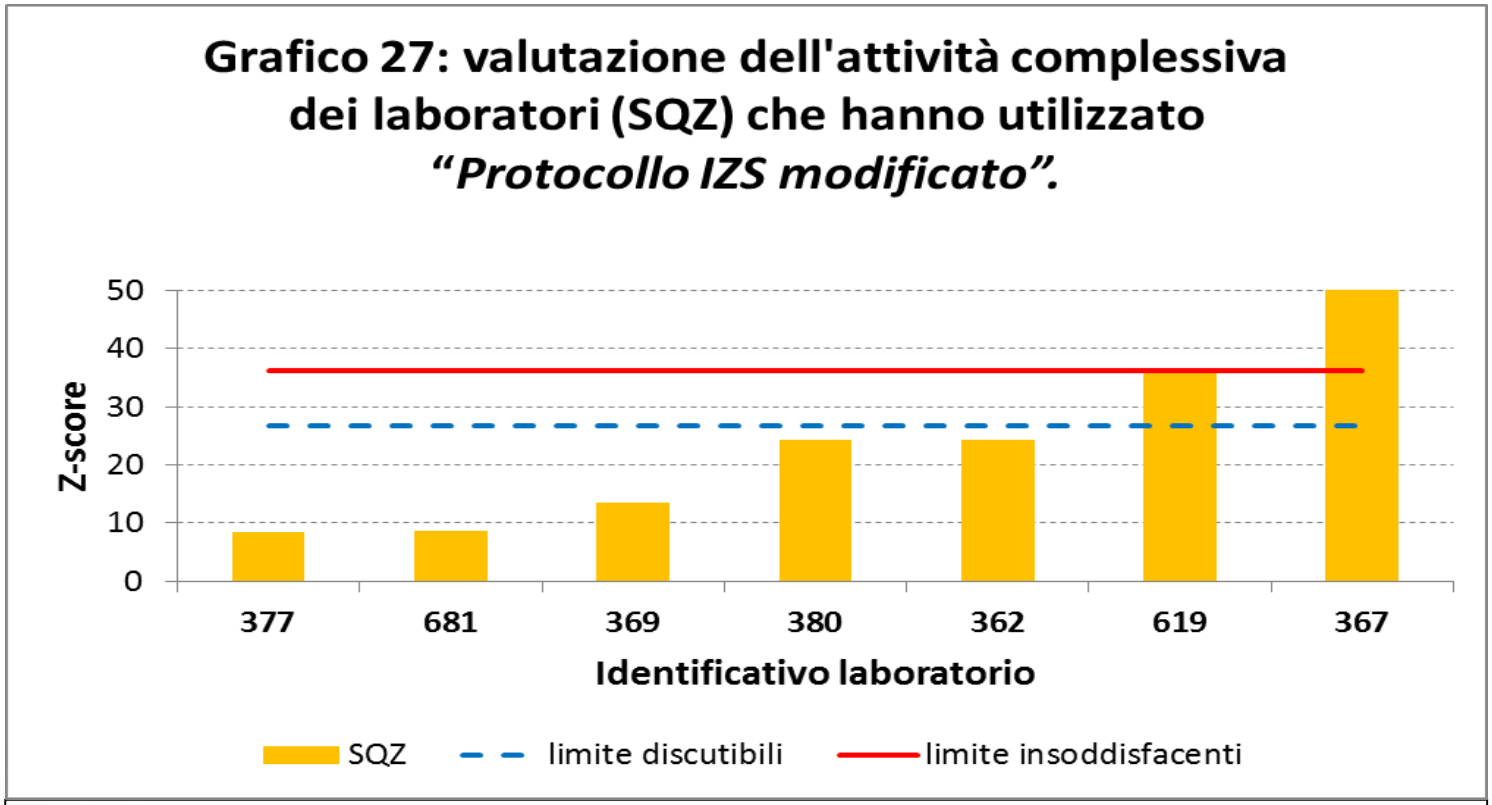


$\lvert RSZ \rvert \leq 2$	soddisfacente
$2 < \lvert RSZ \rvert < 3$	discutibile
$\lvert RSZ \rvert \geq 3$	insoddisfacente

Test quantitativo basato sul numero copie virali: riepilogo dei giudizi relativi ai valori di z-score – Protocollo IZS modificato.

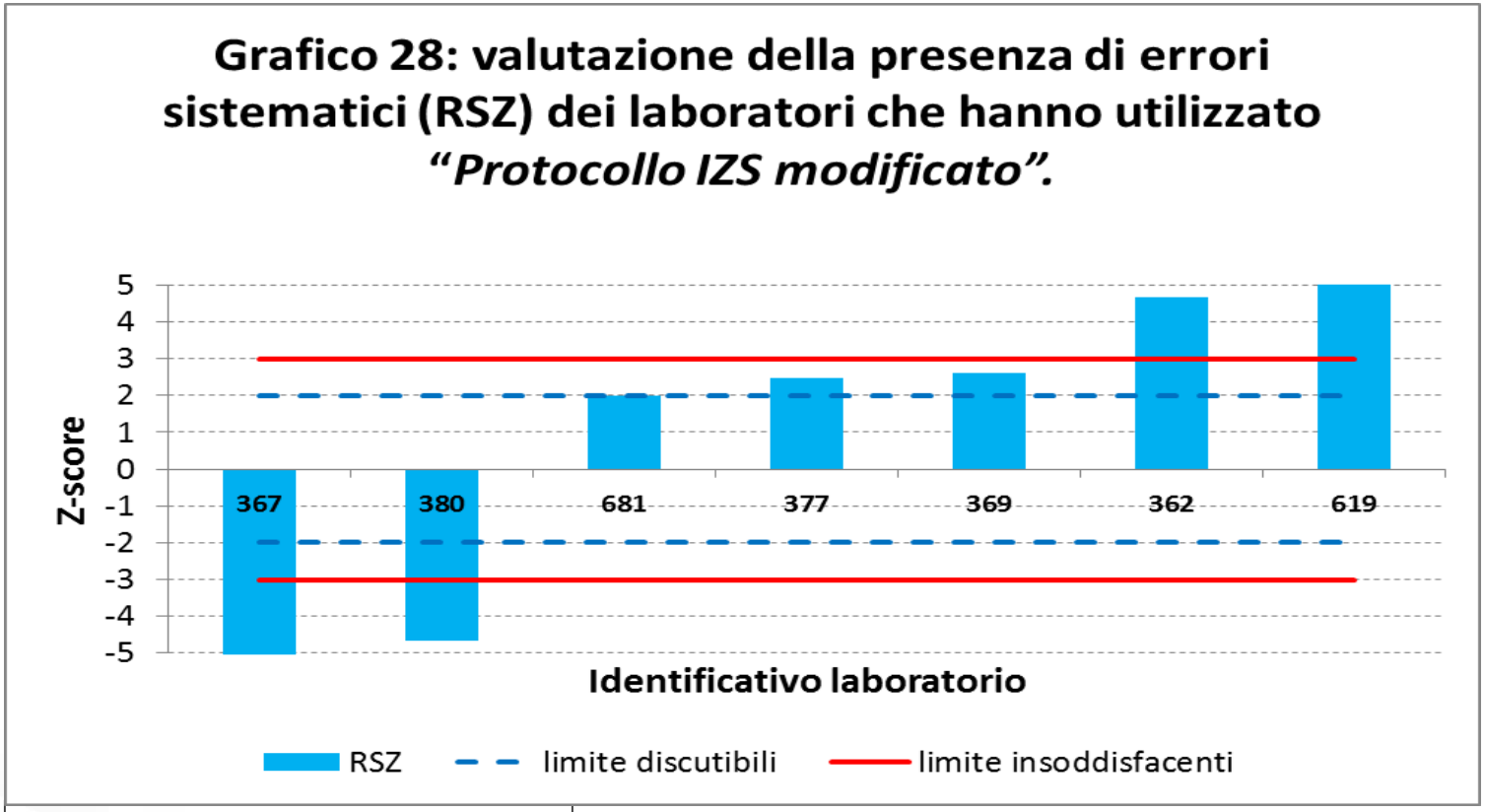
Campione	Virus ($TCID_{50/ml}$)	z-score laboratori		
		Soddisfacenti	Discutibili	Insoddisfacenti
1	*BTV 1 ($10^{6,1}$)*	7		
2	*BTV 1 ($10^{5,1}$)*	5	2	
3	*BTV 1 ($10^{4,1}$)*	6	1	
4	*BTV 1 ($10^{3,1}$)*	7		
5	*BTV 1 ($10^{2,1}$)*	7		
6	*BTV 4 ($10^{5,9}$)*	6	1	
7	*BTV 4 ($10^{4,9}$)*	7		
8	*BTV 4 ($10^{3,9}$)*	7		
9	*BTV 4 ($10^{2,9}$)*	7		
10	*BTV 3 ($10^{5,6}$)*	4	2	1
11	*BTV 3 ($10^{4,6}$)*	6	1	
12	*BTV 8 ($10^{3,1}$)*	7		
13	*BTV 16 ($10^{3,8}$)*	6	1	
14	*BTV 24 ($10^{3,4}$)*	6	1	
15	*BTV 26 ($10^{4,1}$)*	5		2
16	*BTV 27 ($10^{3,9}$)*	5	1	1

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



$SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0455; n)	**soddisfacente**
SQZ (α = 0,0455; n) $\leq SQZ_{lab} \leq$ SQZ (α = 0,0027; n)	**discutibile**
$SQZ_{lab} \geq SQZ$ (α = 0,0027; n)	**insoddisfacente**

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)

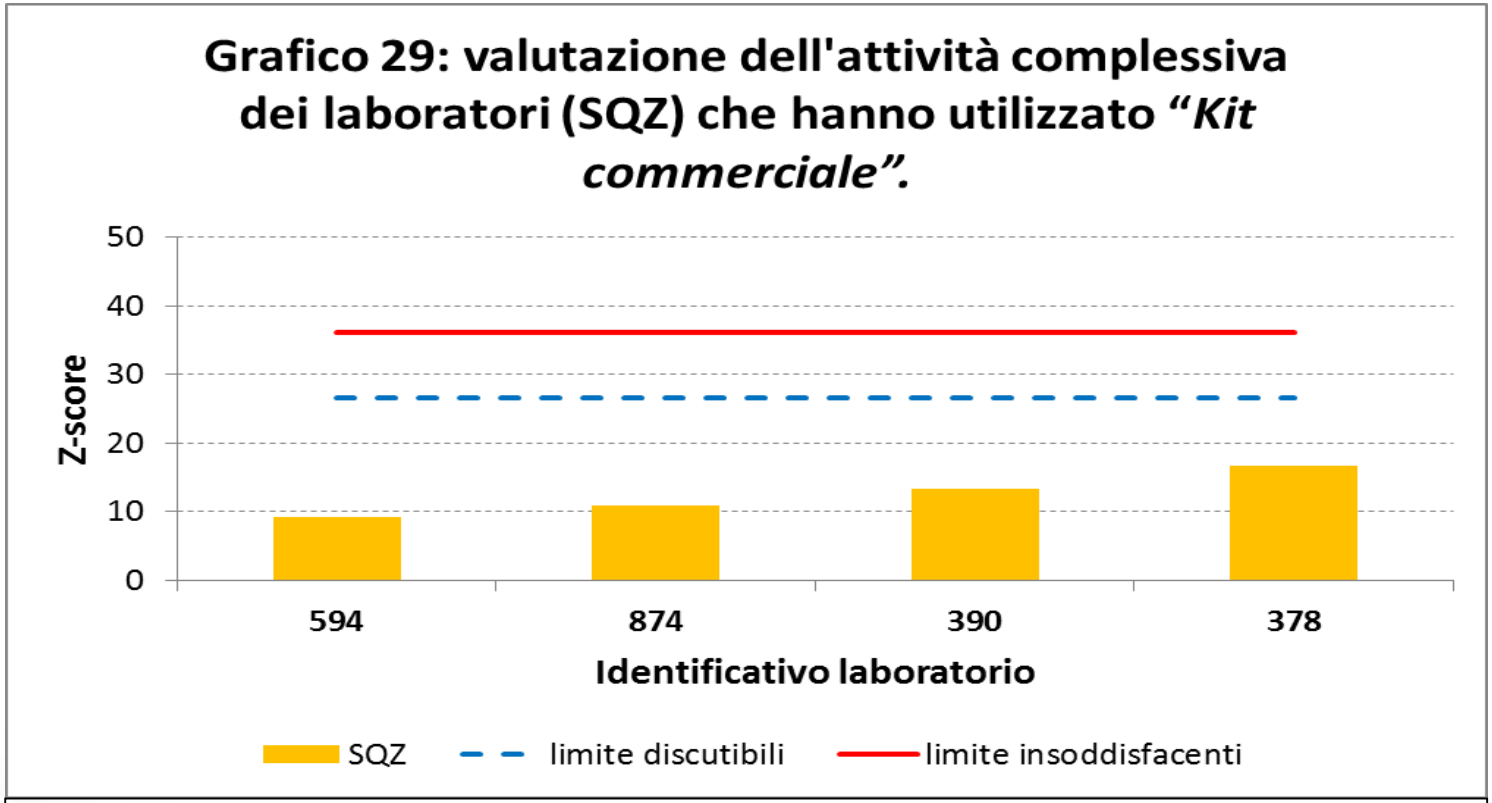


$\lvert RSZ \rvert \leq 2$	soddisfacente
$2 < \lvert RSZ \rvert < 3$	discutibile
$\lvert RSZ \rvert \geq 3$	insoddisfacente

Test quantitativo basato sul numero copie virali: riepilogo dei giudizi relativi ai valori di z-score – Kit commerciale.

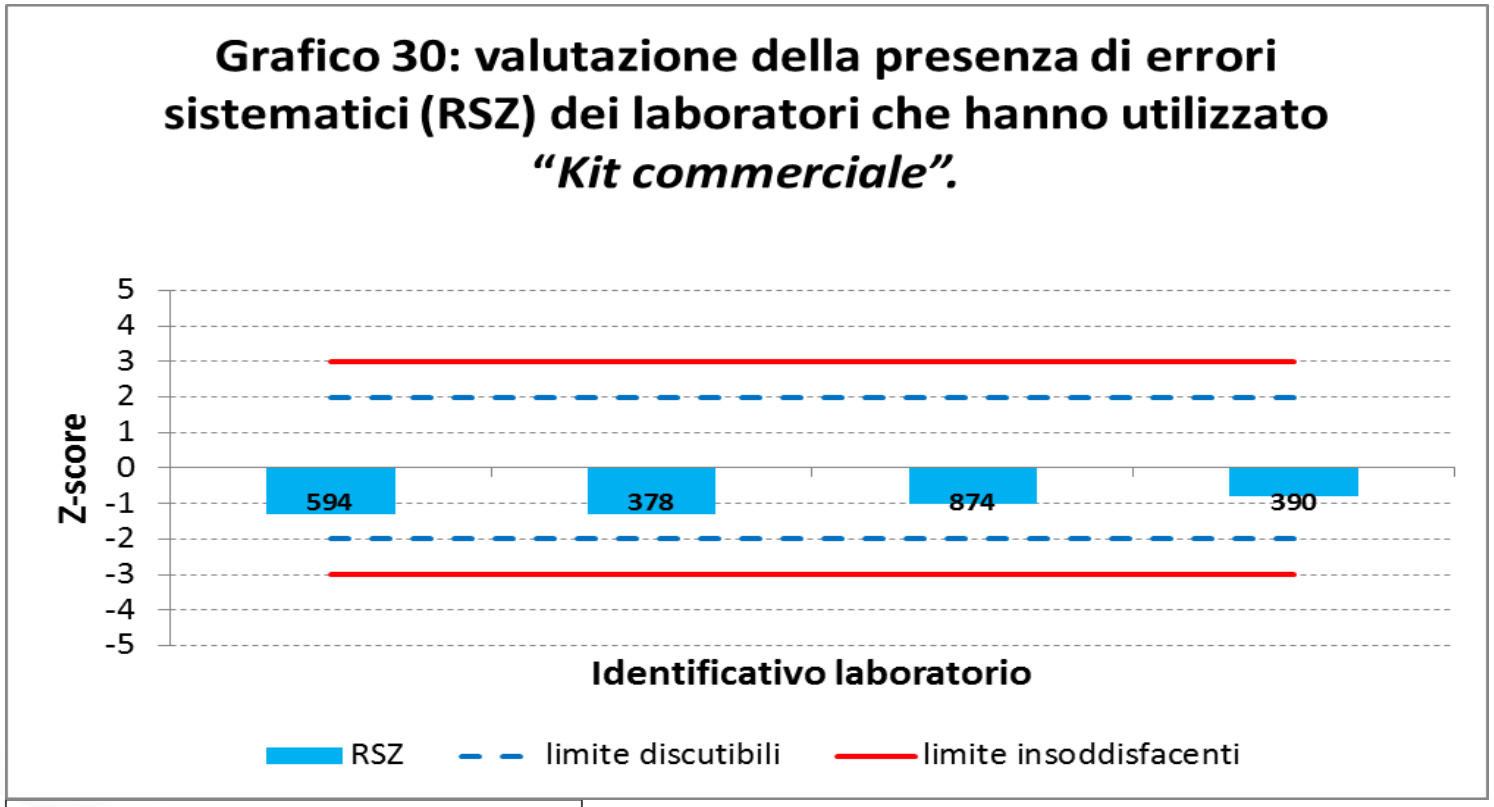
Campione	Virus ($TCID_{50/ml}$)	z-score laboratori		
		Soddisfacenti	Discutibili	Insoddisfacenti
1	*BTV 1 ($10^{6,1}$)*	4		
2	*BTV 1 ($10^{5,1}$)*	4		
3	*BTV 1 ($10^{4,1}$)*	4		
4	*BTV 1 ($10^{3,1}$)*	4		
5	*BTV 1 ($10^{2,1}$)*	3	1	
6	*BTV 4 ($10^{5,9}$)*	4		
7	*BTV 4 ($10^{4,9}$)*	4		
8	*BTV 4 ($10^{3,9}$)*	4		
9	*BTV 4 ($10^{2,9}$)*	4		
10	*BTV 3 ($10^{5,6}$)*	3	1	
11	*BTV 3 ($10^{4,6}$)*	4		
12	*BTV 8 ($10^{3,1}$)*	4		
13	*BTV 16 ($10^{3,8}$)*	4		
14	*BTV 24 ($10^{3,4}$)*	4		
15	*BTV 26 ($10^{4,1}$)*	4		
16	*BTV 27 ($10^{3,9}$)*	4		

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



$SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0455; n)	**soddisfacente**
SQZ (α = 0,0455; n) $\leq SQZ_{lab} \leq SQZ$ (α = 0,0027; n)	**discutibile**
$SQZ_{lab} \geq SQZ$ (α = 0,0027; n)	**insoddisfacente**

Test quantitativo basato sul numero copie virali: Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)



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

Conclusioni…

- **Risultati qualitativi**: tutti i laboratori partecipanti, che hanno utilizzato uno dei seguenti protocolli, *Protocollo IZS, Protocollo IZS modificato* e *Kit commerciale,* hanno prodotto risultati corretti, anche per i campioni a più basso titolo virale.

- **Risultati quantitativi sulla base dei Ct**:

  SQZ_{Ct} **:** 5 insodd. su 17 laboratori

  RSZ_{Ct} **:** 8 laboratori hanno sistematicamente evidenziato una sottostima del contenuto virale ($Ct_{campioni} > Ct_{ref}$) o una sovrastima ($Ct_{campioni} < Ct_{ref}$).

- Per il test quantitativo basato sui Ct non è stata evidenziata relazione tra errori sistematici e protocollo utilizzato.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

OIE Reference Laboratory Bluetongue

…Conclusioni

- **Test di quantificazione RNA virale mediante plasmide pGEM-NS3**:

- variabilità, tra i 18 set di risultati, delle stime di RNA virale.

- le rette di riferimento ottenute con i tre protocolli, *Protocollo IZS*, *Protocollo IZS modificato* e *Kit commerciale,* sono risultate parallele evidenziando una omogenea prestazione di amplificazione.

- SQZ_{RNA} : 1 insodd. su 18 set di risultati (16 laboratori)

- RSZ_{RNA} : 12 set/lab hanno sistematicamente evidenziato una sottostima o sovrastima del contenuto virale

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

OIE Reference Laboratory Bluetongue

…Conclusioni

- considerando la variabilità delle stime di RNA, gli errori sistematici, in termini di sovrastima o sottostima, il parallelismo delle rette ottenute con il plasmide (sottoposto al solo step di amplificazione di ciascun protocollo utilizzato), non è possibile, allo stato attuale, evidenziare eventuali associazioni tra quanto emerso e i protocolli utilizzati.

Studio di comparazione protocolli diagnosi BTV

Kit isolamento acidi nucleici	Tipologia metodo isolamento	Kit amplificazione Real time RT_PCR	Ditta
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Spin column	Super Script III Platinum	Roche/Invitrogen/IZSAM-OIE
MagMax Core nucleic acid purification kit	Magnetic beads	Super Script III Platinum	Applied biosystems/Invitrogen/IZSAM-OIE
MagAttract 96 cador Pathogen Kit	Magnetic beads	VirotypeBTV pan/4 RT-PCR Kit	Qiagen
ID-Gene Mag Fast Extraction Kit	Magnetic beads	ID-Gene Bluetongue Duplex	ID-Vet
MagMax Core nucleic acid purification kit	Magnetic beads	VetMax BTV NS3 All Genotypes Kit	Applied biosystems

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Reference Laboratory
Bluetongue

Grazie!!