



CIRCUITO INTER-LABORATORIO

BLUETONGUE RT-PCR

Distribuzione 1/2011

Ottavio Portanti.

«Giornata di studio sulla Bluetongue», Istituto «G. Caporale» Teramo.

27 novembre 2012.

- Al quinto circuito inter-laboratorio per la diagnosi virologica della Bluetongue hanno aderito 15 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 gennaio 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 un identificativo numerico è stato attribuito ad ogni campione inviato

Ceppi BTV ed EHDV utilizzati per infettare i campioni di sangue

n° campione	Ceppo	Titolo (TCID ₅₀ /ml)
1	<i>BTV 1</i>	$10^{6.1}$
2	<i>BTV 2</i>	$10^{5.0}$
3	<i>BTV 4</i>	$10^{6.0}$
4	<i>BTV 8</i>	$10^{5.2}$
5	<i>BTV 8</i>	$10^{4.2}$
6	<i>BTV 8</i>	$10^{3.2}$
7	<i>BTV 9</i>	$10^{5.0}$
8	<i>BTV 9</i>	$10^{4.0}$
9	<i>BTV 9</i>	$10^{2.0}$
10	<i>BTV 12</i>	$10^{4.8}$
11	<i>BTV 12</i>	$10^{3.8}$
12	<i>BTV 16</i>	$10^{3.3}$
13	<i>BTV 24</i>	$10^{3.9}$
14	<i>BTV 24</i>	$10^{2.9}$
15	<i>EHDV 6</i>	$10^{5.6}$
16	<i>EHDV 7</i>	$10^{5.5}$

Decodifica campioni

Identificativo campione	358	361	362	365	367	368	369	377	378	380	390	594	619	681	682
1	277	134	249	63	100	228	51	254	193	225	250	104	221	295	85
2	267	14	98	201	242	163	260	1	202	76	179	129	71	287	160
3	264	42	124	120	232	73	77	38	206	93	86	173	13	282	258
4	275	31	4	103	161	210	48	194	17	88	122	117	81	292	214
5	274	19	169	209	33	175	44	139	227	23	92	47	187	281	18
6	270	168	3	132	109	180	2	32	188	148	197	240	223	288	229
7	261	189	29	96	208	79	7	62	95	211	255	205	176	290	24
8	280	99	54	20	241	113	111	147	204	219	162	172	183	300	222
9	279	112	64	89	75	90	151	11	158	8	67	121	144	283	16
10	268	70	218	126	141	178	234	35	237	116	182	115	203	285	52
11	276	244	165	230	87	186	119	216	127	107	185	12	91	289	82
12	272	171	110	101	83	154	128	220	196	39	256	118	55	286	224
13	269	199	145	53	143	130	106	138	34	57	190	123	150	299	212
14	262	166	181	60	236	226	159	5	94	252	28	59	80	297	157
15	278	153	140	74	66	191	30	65	56	170	192	25	41	293	156
16	266	133	152	21	149	105	259	233	217	61	253	9	26	294	43
17	273	36	137	142	135	84	231	184	10	207	246	15	247	291	235
18	265	46	239	72	6	213	45	155	257	215	50	27	102	298	49
19	263	167	58	243	22	125	136	131	177	78	248	195	68	296	97
20	271	174	69	108	198	245	146	238	164	114	251	200	40	284	37

- I campioni infettati sono stati testati per valutare la loro omogeneità e stabilità
- 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 termici (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

Identificativo campione	media	dev.st.	mln.	max.	CV	T2	Variazione tra I campioni	g.d.l.
1	23,79	0,56	22,93	24,92	0,02	0,14	0,02	7
2	23,73	0,83	22,55	25,82	0,03	0,32	0,05	7
3	20,14	0,52	19,29	20,94	0,03	0,15	0,02	7
4	24,49	0,70	23,41	25,57	0,03	0,22	0,03	7
5	27,36	0,92	25,67	28,90	0,03	0,34	0,05	7
6	31,41	0,76	30,10	32,51	0,02	0,20	0,03	7
7	25,70	0,82	24,47	27,39	0,03	0,28	0,04	7
8	29,57	0,86	27,39	30,76	0,03	0,21	0,03	7
9	35,58	1,98	29,70	37,69	0,06	0,15	0,02	7
10	29,62	2,38	27,16	36,76	0,08	0,23	0,03	7
11	31,91	1,84	26,76	33,32	0,06	1,08	0,15	7
12	28,17	2,03	26,39	33,81	0,07	0,46	0,07	7
13	28,26	1,04	26,96	30,27	0,04	0,04	0,01	7
14	32,96	3,93	29,08	37,69	0,12	0,45	0,06	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	24,92	22,93	1,99	23,524+0,007*t	0,007	0,239
2	25,82	22,55	3,26	23,436+0,008*t	0,008	0,383
3	20,94	19,29	1,65	19,909+0,006*t	0,006	0,691
4	25,57	23,41	2,16	23,682+0,022*t	0,022	< 0,0001
5	28,90	25,67	3,22	27,115+0,007*t	0,007	0,510
6	32,51	30,10	2,41	30,972+0,012*t	0,012	0,138
7	27,39	24,47	2,92	25,286+0,012*t	0,012	0,200
8	30,76	28,60	2,16	29,924-0,005*t	0,005	0,447
9	37,69	35,07	2,61	35,835+0,009*t	0,009	0,250
10	30,08	27,16	2,92	28,840+0,006*t	0,006	0,519
11	33,81	26,76	7,06	32,204+0,001*t	0,001	0,978
12	29,73	26,39	3,33	26,929+0,023*t	0,023	0,033
13	30,27	26,96	3,31	28,464+0,009*t	0,009	0,448
14	34,52	28,54	5,98	31,188+0,007*t	0,007	0,684
15	45,00	45,00	0,00	45,000+0,000*t	0,000	-
16	45,00	45,00	0,00	45,000+0,000*t	0,000	-
17	45,00	45,00	0,00	45,000+0,000*t	0,000	-
18	45,00	45,00	0,00	45,000+0,000*t	0,000	-
19	45,00	45,00	0,00	45,000+0,000*t	0,000	-
20	45,00	45,00	0,00	45,000+0,000*t	0,000	-

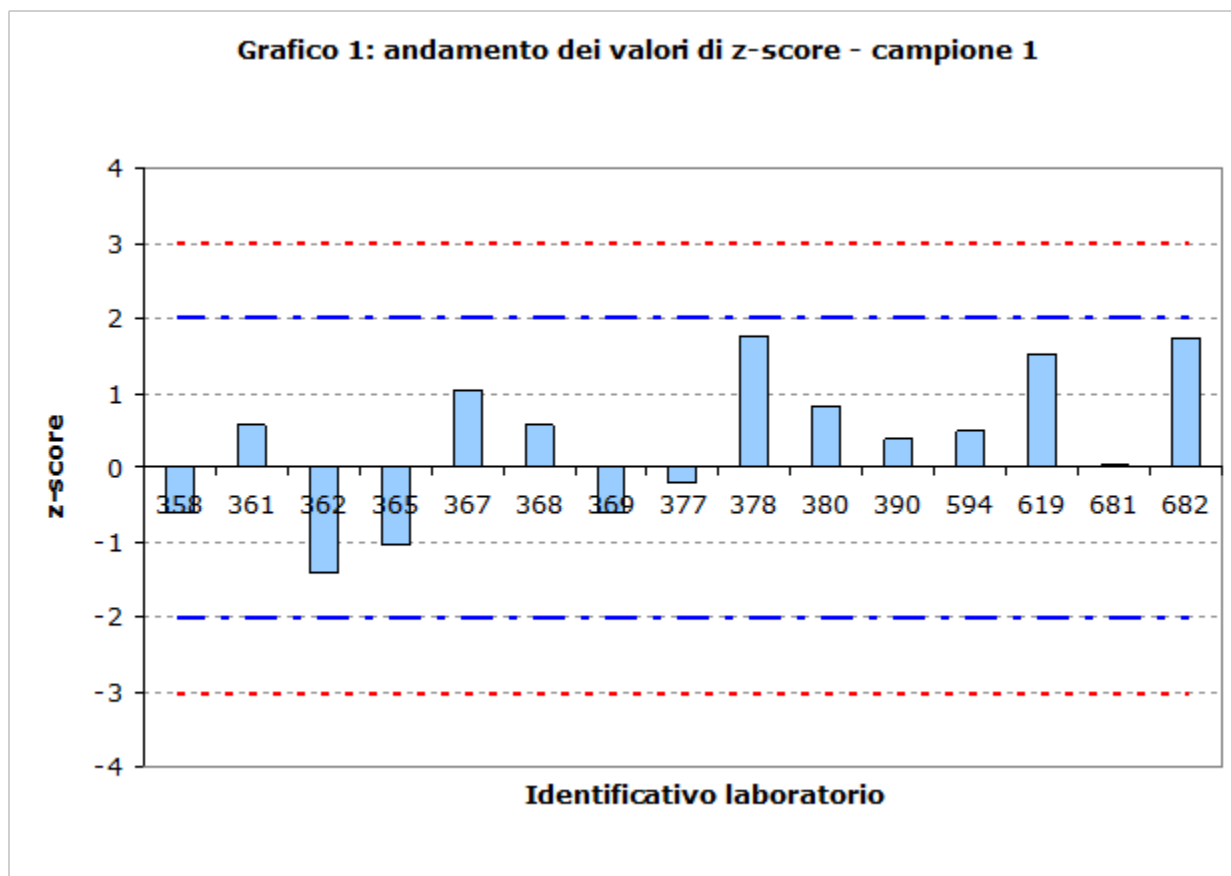
Metodi impiegati dai laboratori

Nome prova	ID laboratorio	Metodo	Procedura	Ente/ditta emittente
Protocollo ICT / Kit commerciale	358, 361, 362, 365, 367, 368, 369, 377, 378, 380, 390, 594, 619, 681, 682	Real time RT-PCR	IZS TE B2.1.9 SOP016 "Identificazione mediante RT-PCR real-time "one-step" del virus della Bluetongue" / Kit TaqVet Bluetongue Virus All Genotypes	Istituto "G.Caporale" Teramo / Laboratoire Service International (LSI), Lissieu, Francia
Protocollo PCR convenzionale	362, 368, 378, 390, 594, 682.	RT-PCR	IZS TE B2.1.9 SOP005 " Ricerca del virus della Bluetongue mediante retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)"	Istituto "G.Caporale" Teramo

Valutazione statistica dei risultati (test quantitativo)

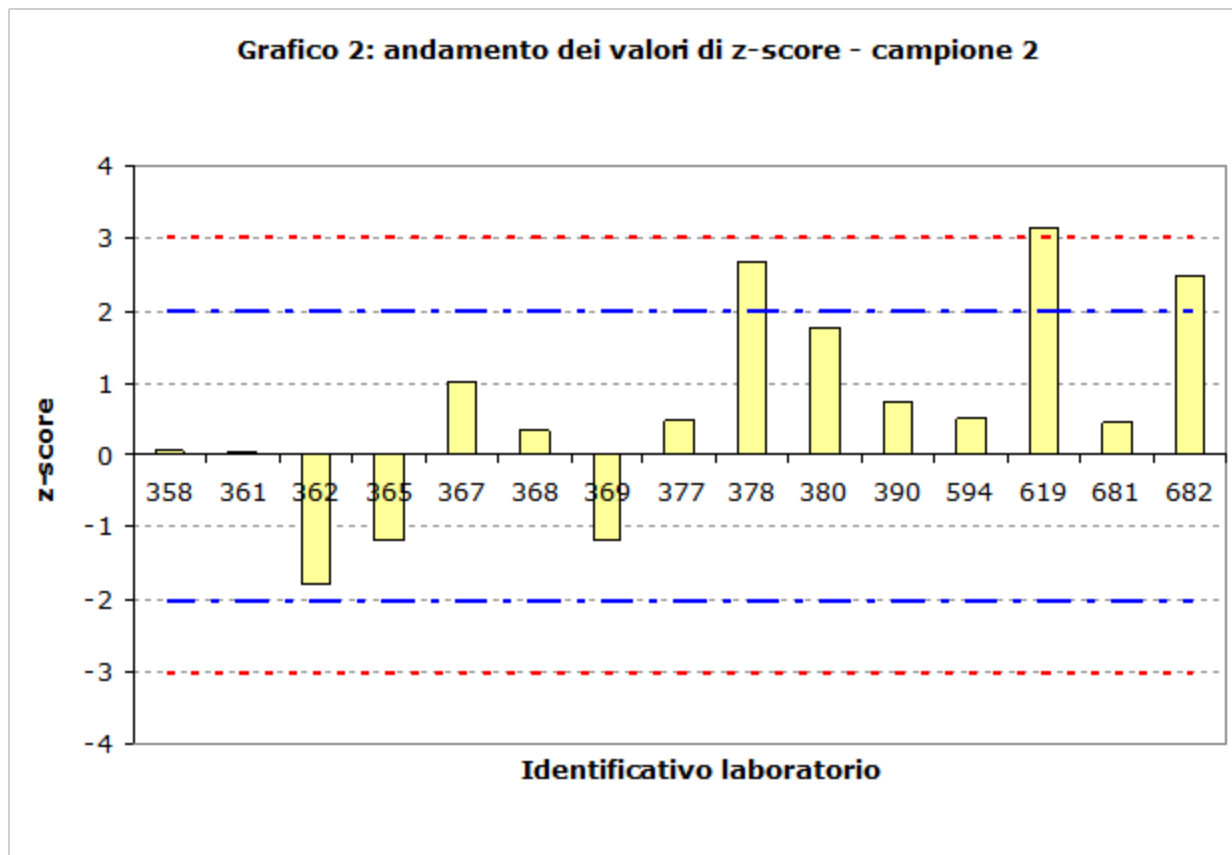
- Calcolo del valore di z-score
- Valutazione della prestazione globale del laboratorio mediante calcolo di un indice definito dalla somma dei quadrati dei valori di z-score del singolo laboratorio (SQZlab)
- Verifica della presenza di errori sistematici nei risultati forniti dai laboratori mediante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

Grafici z-score



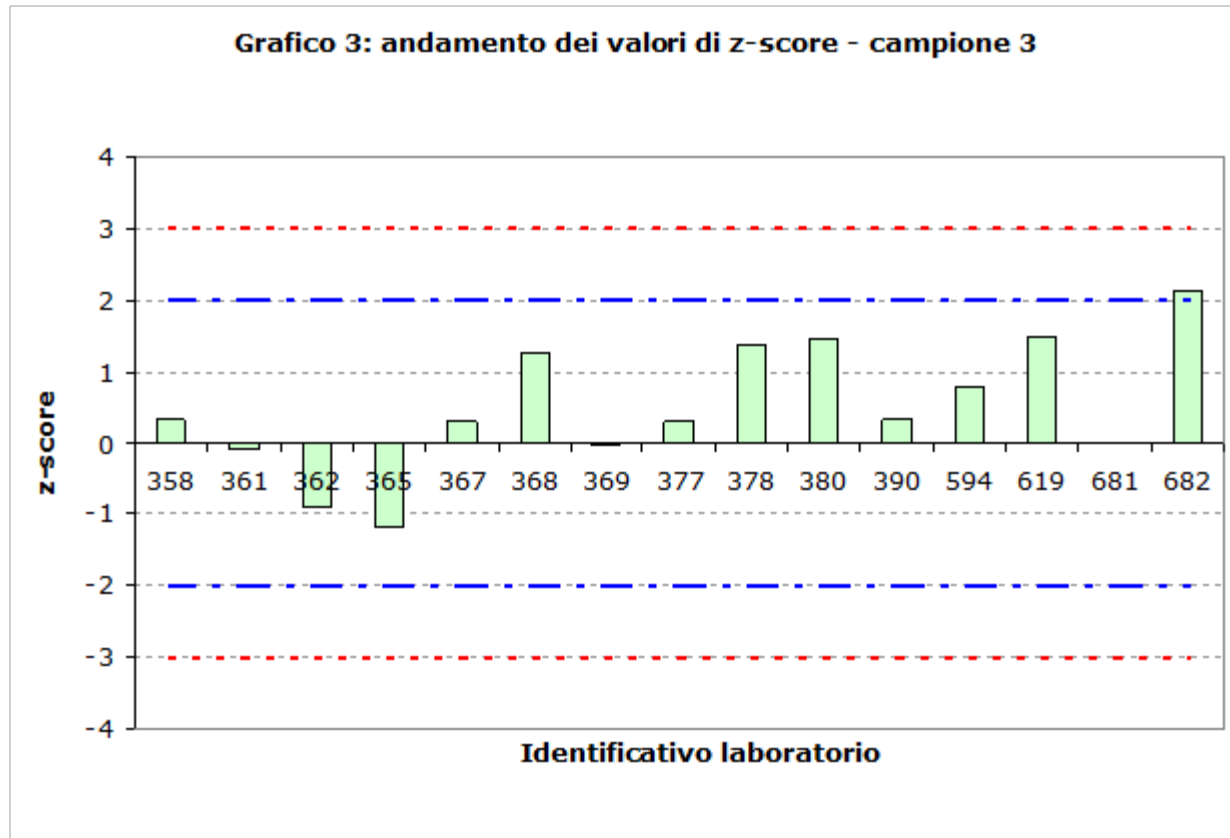
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score

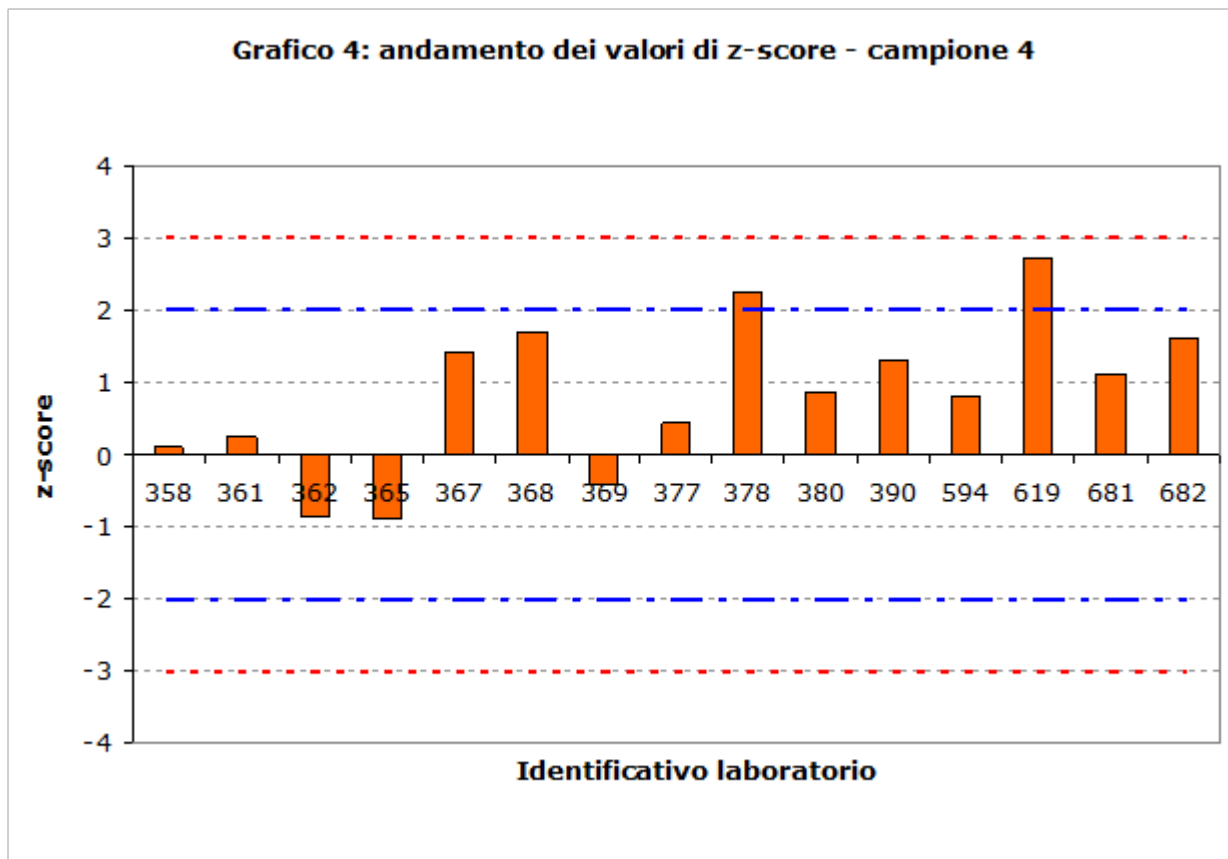


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score

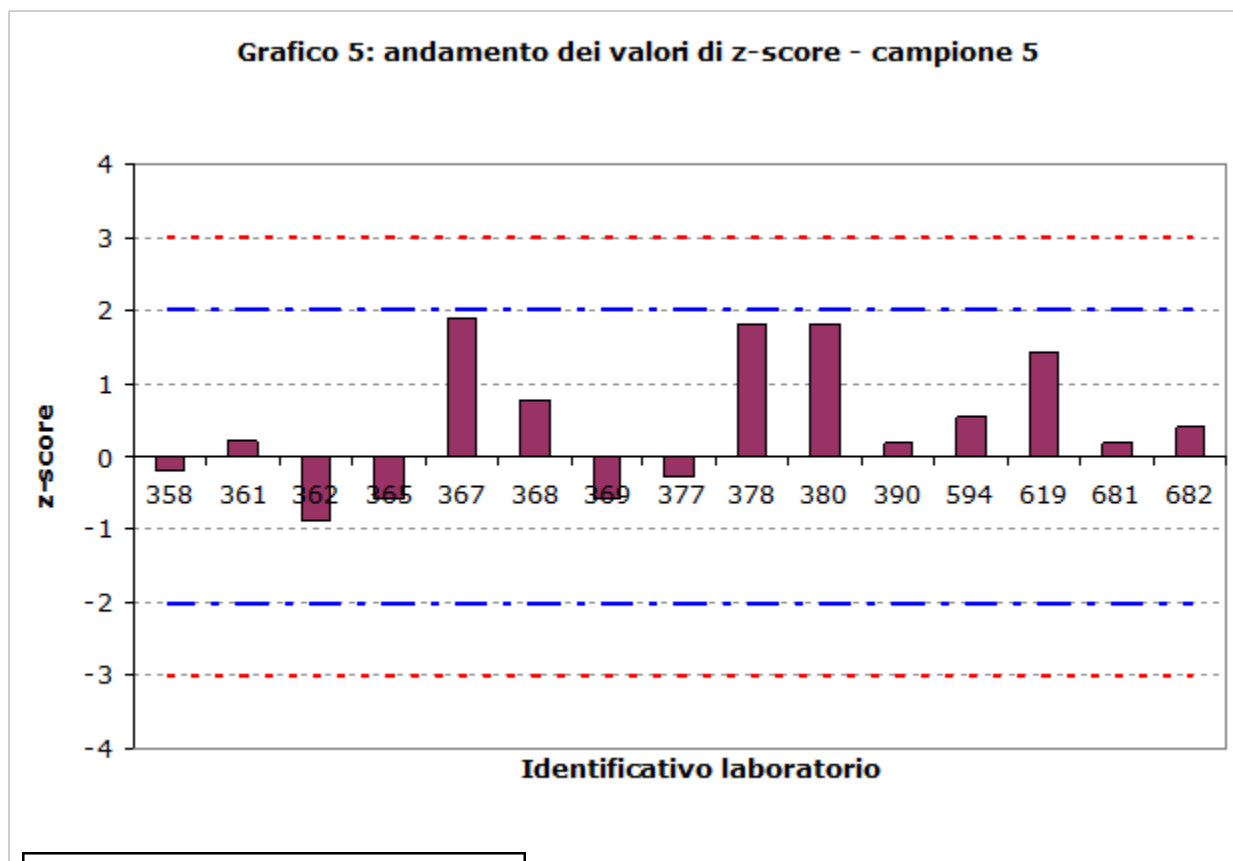


$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



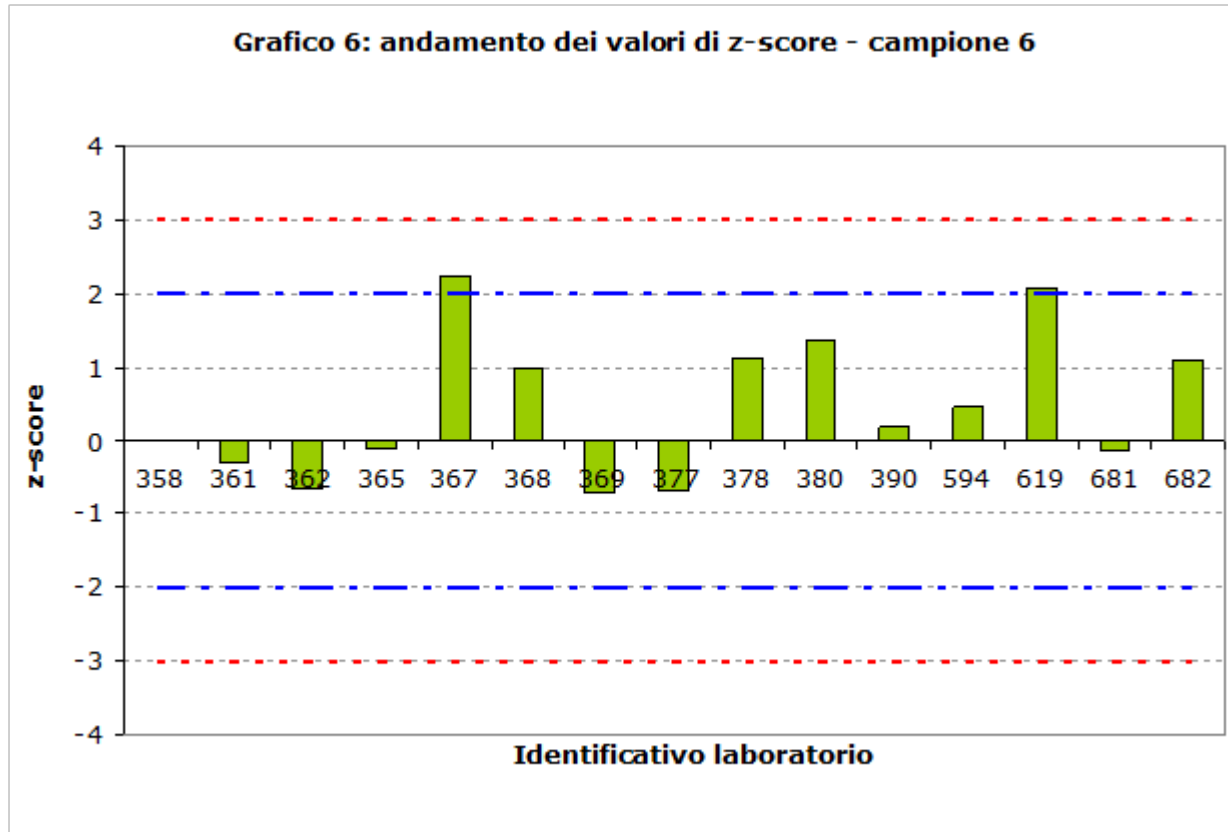
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



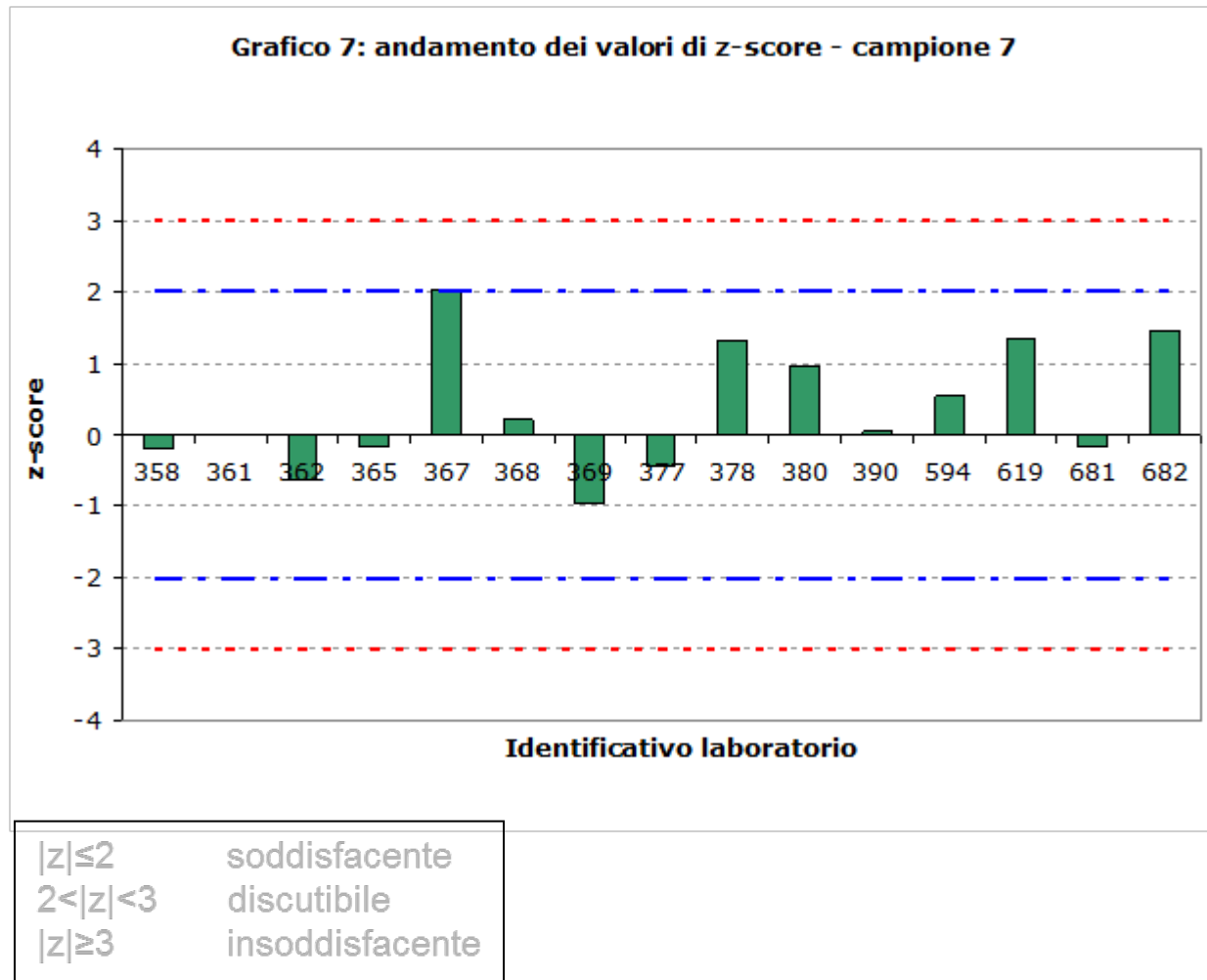
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

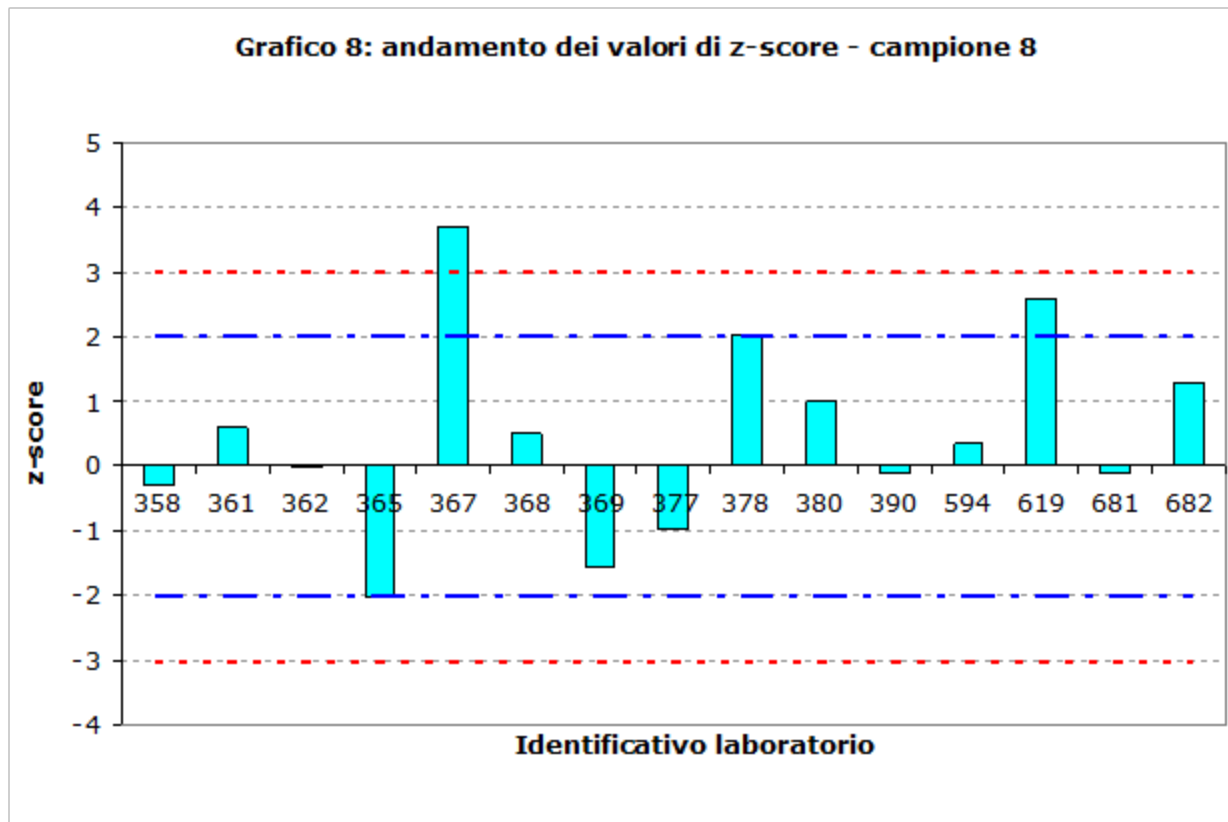
Grafici z-score



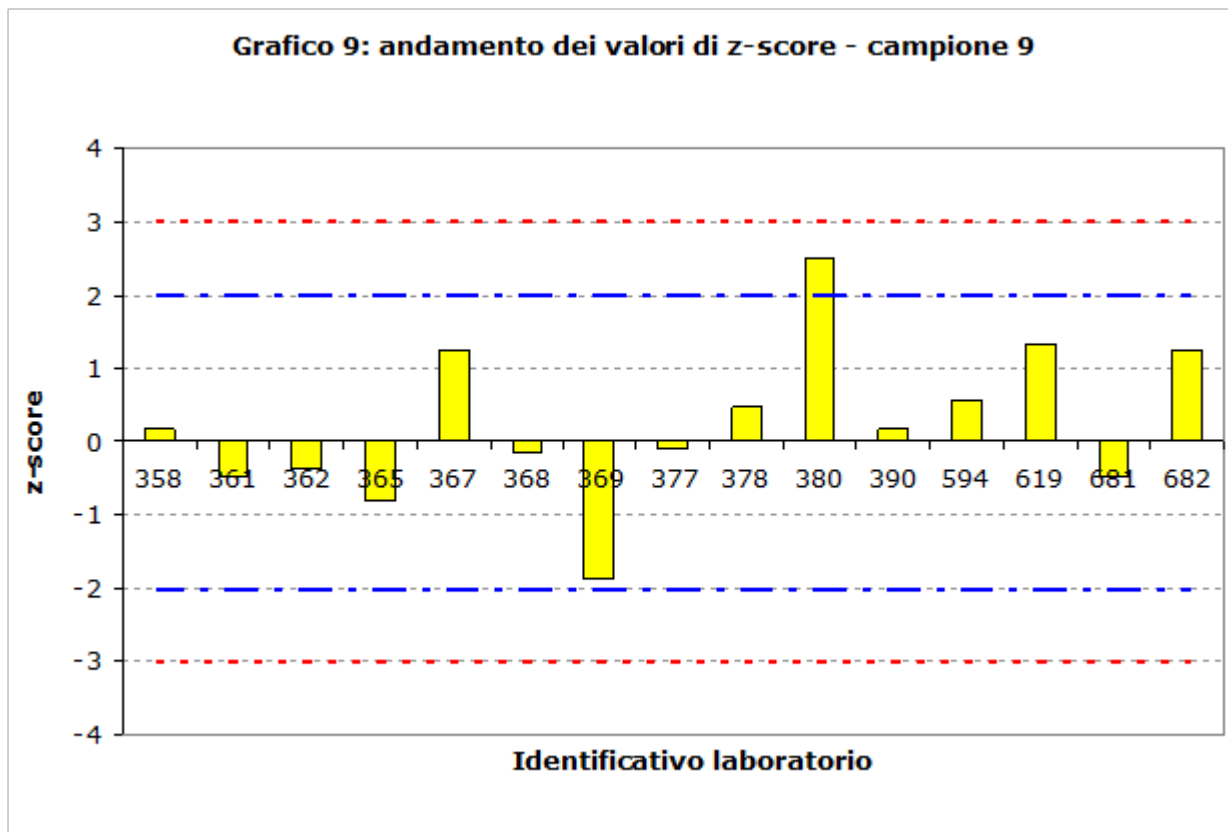
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score

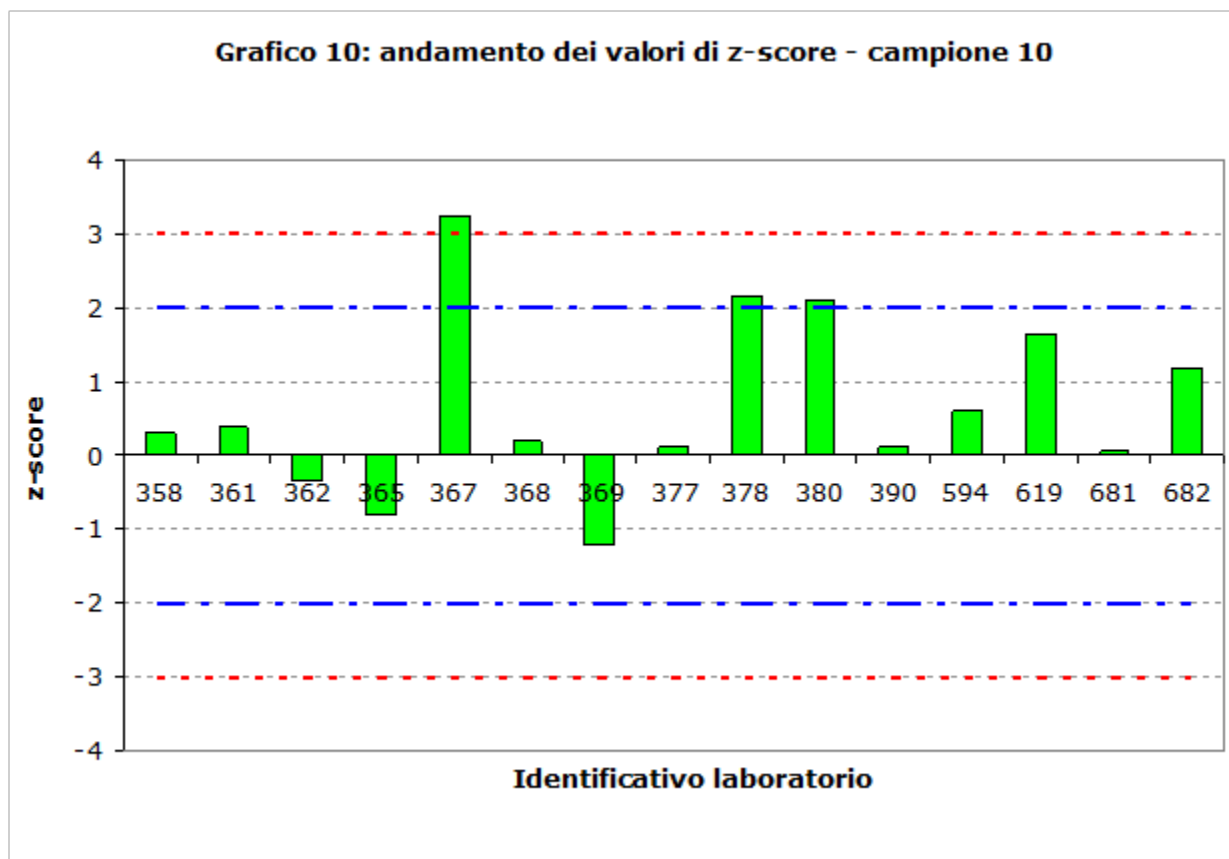




$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



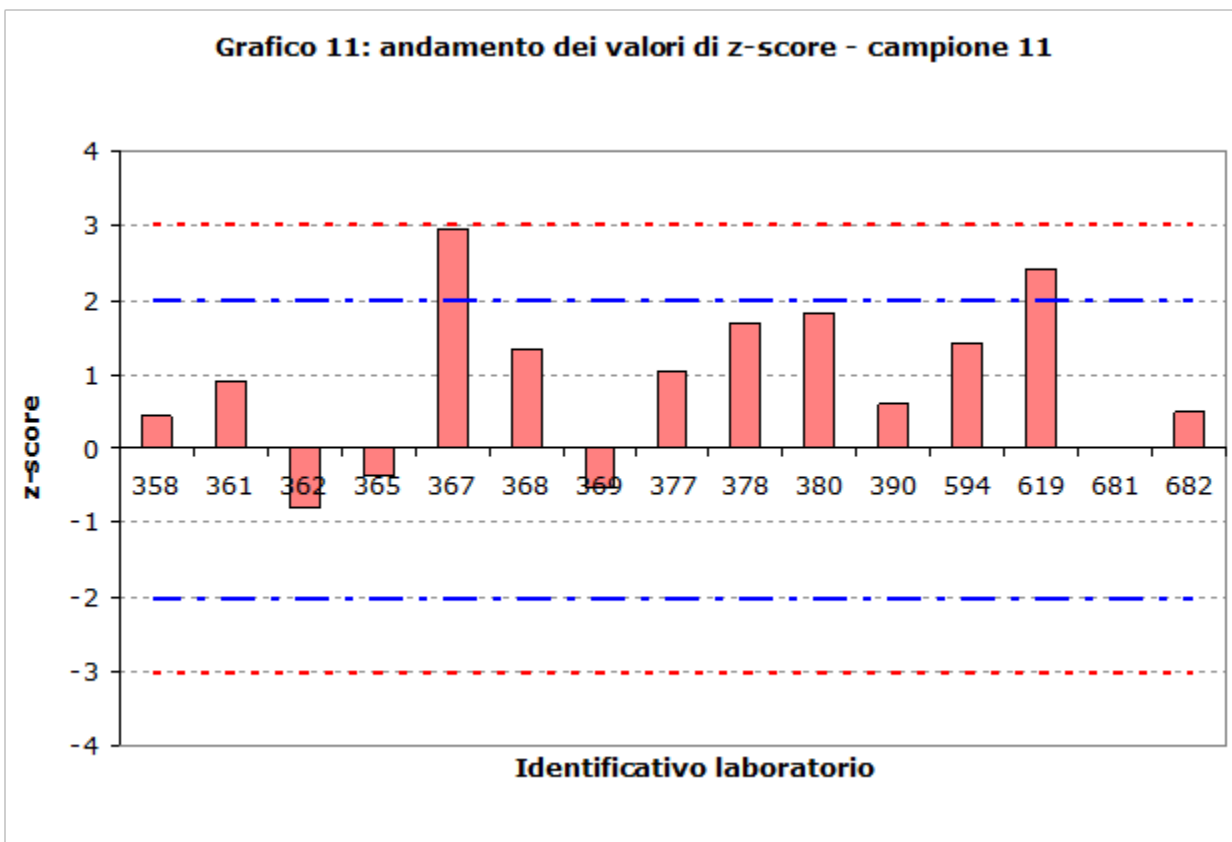
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente



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

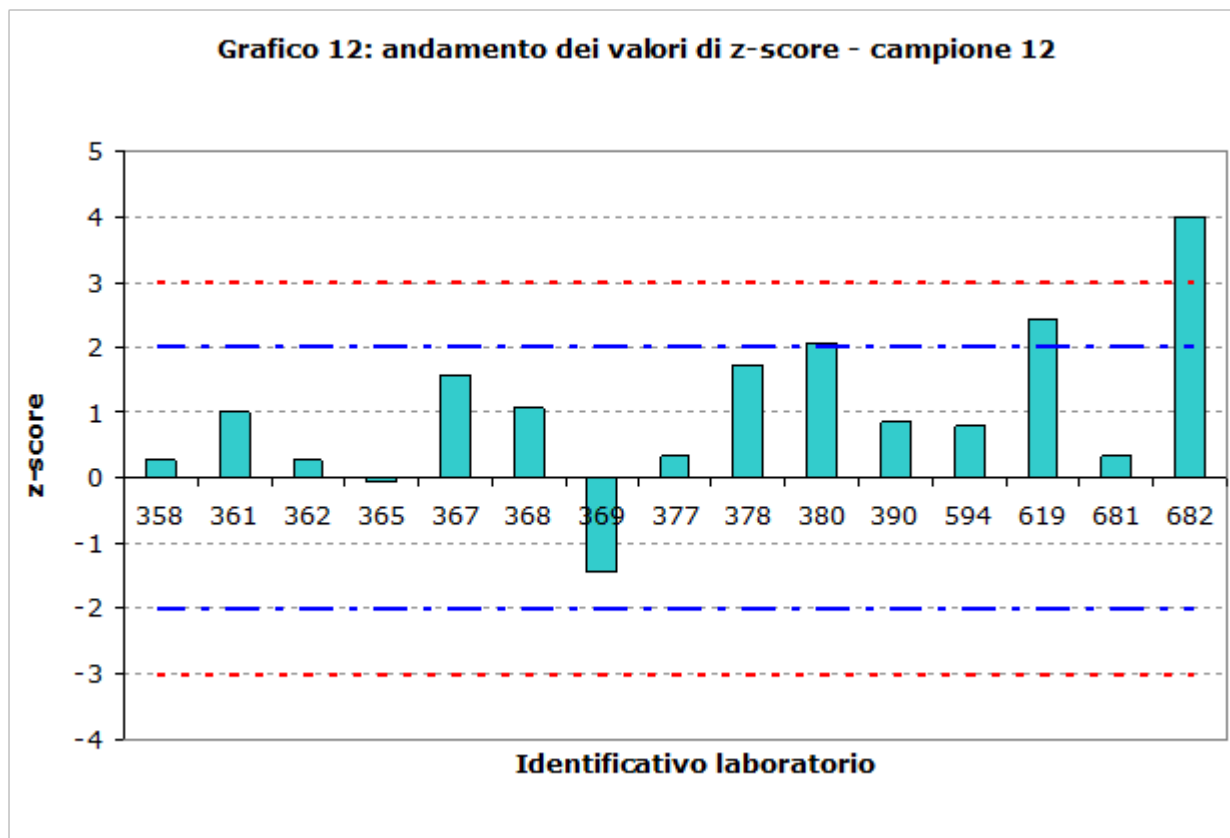
Grafici z-score

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



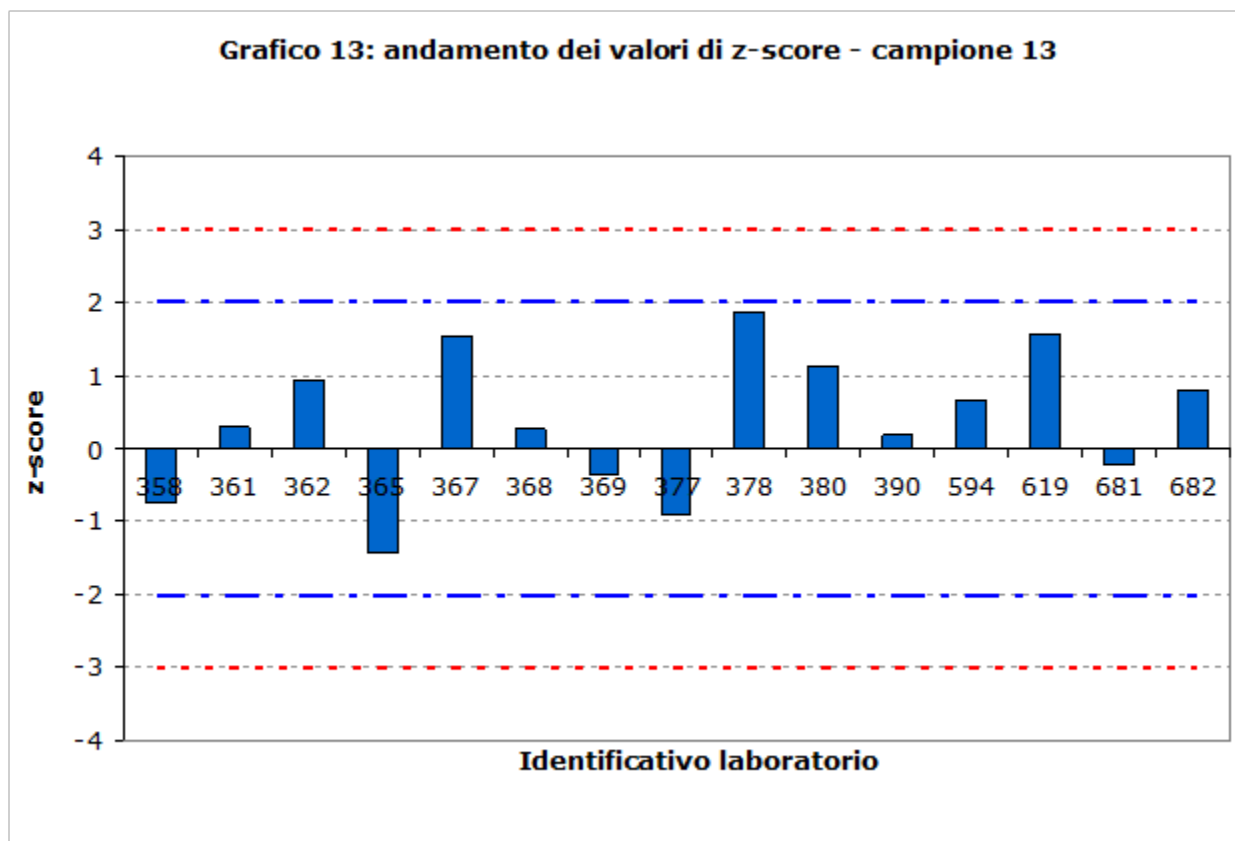
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafico 12: andamento dei valori di z-score - campione 12



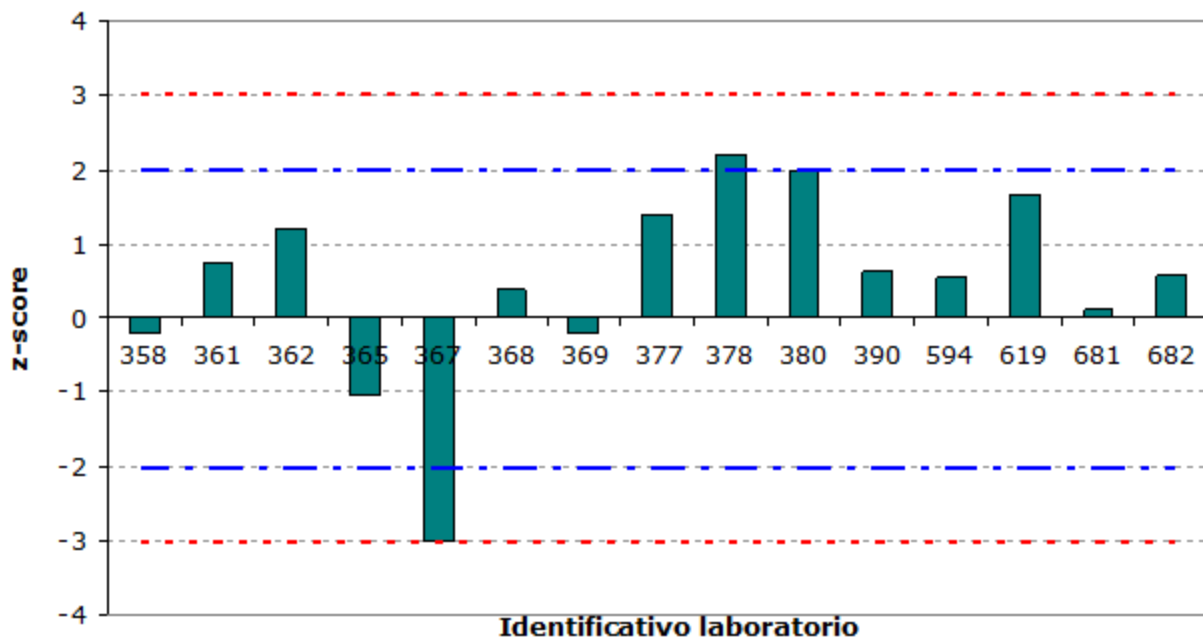
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



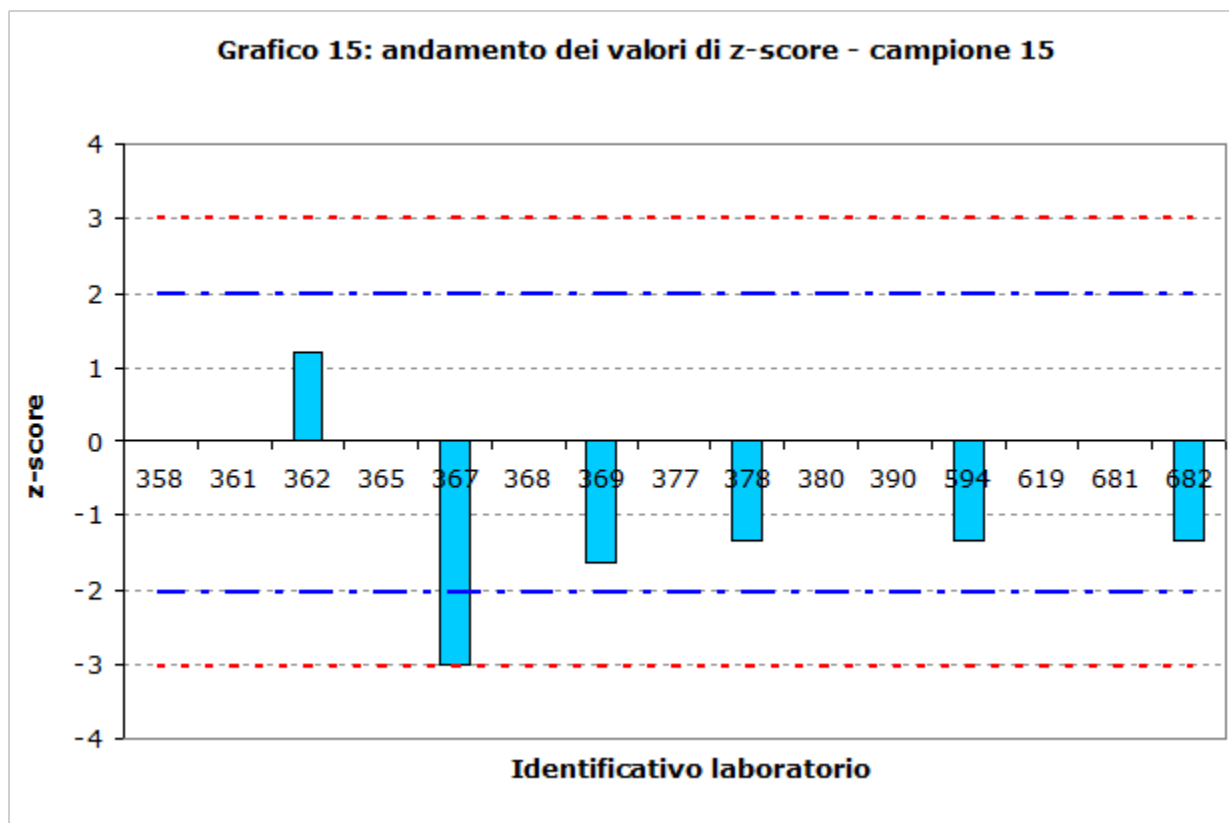
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafico 14: andamento dei valori di z-score - campione 14



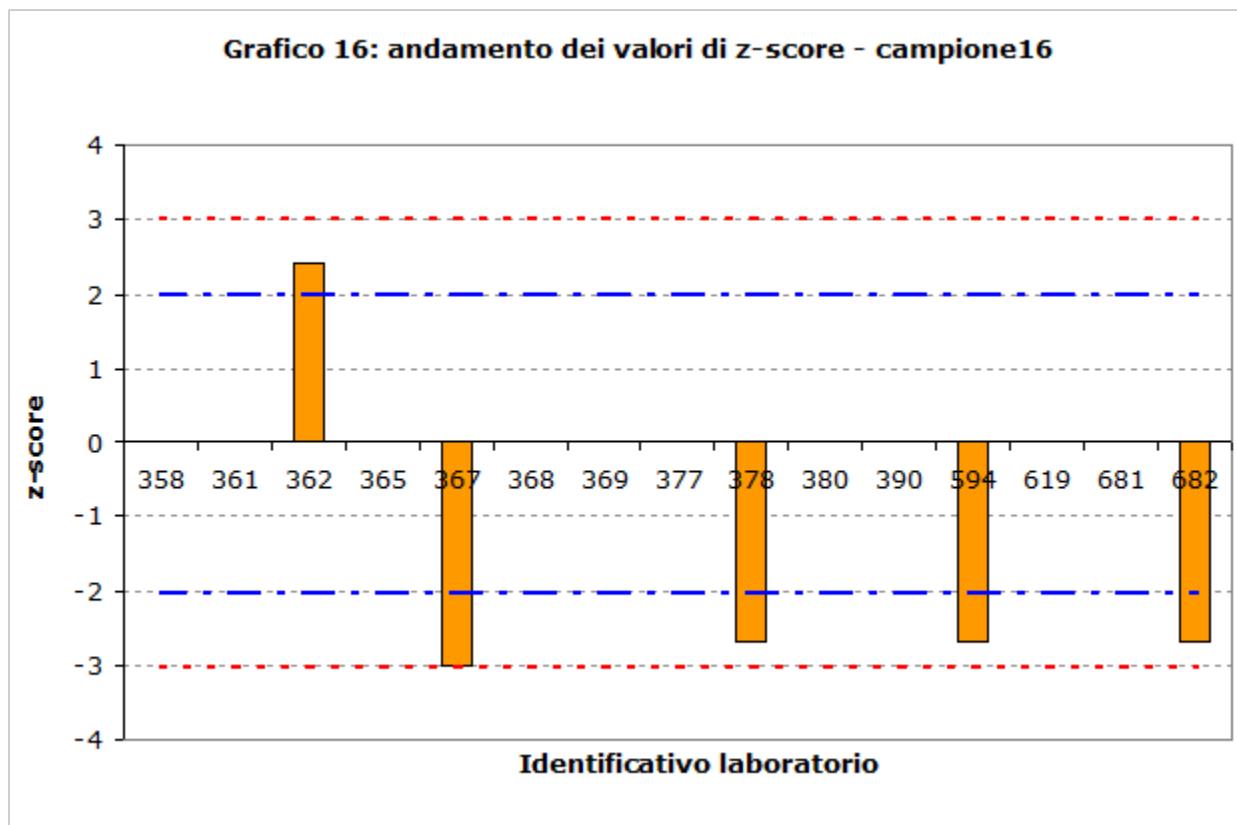
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



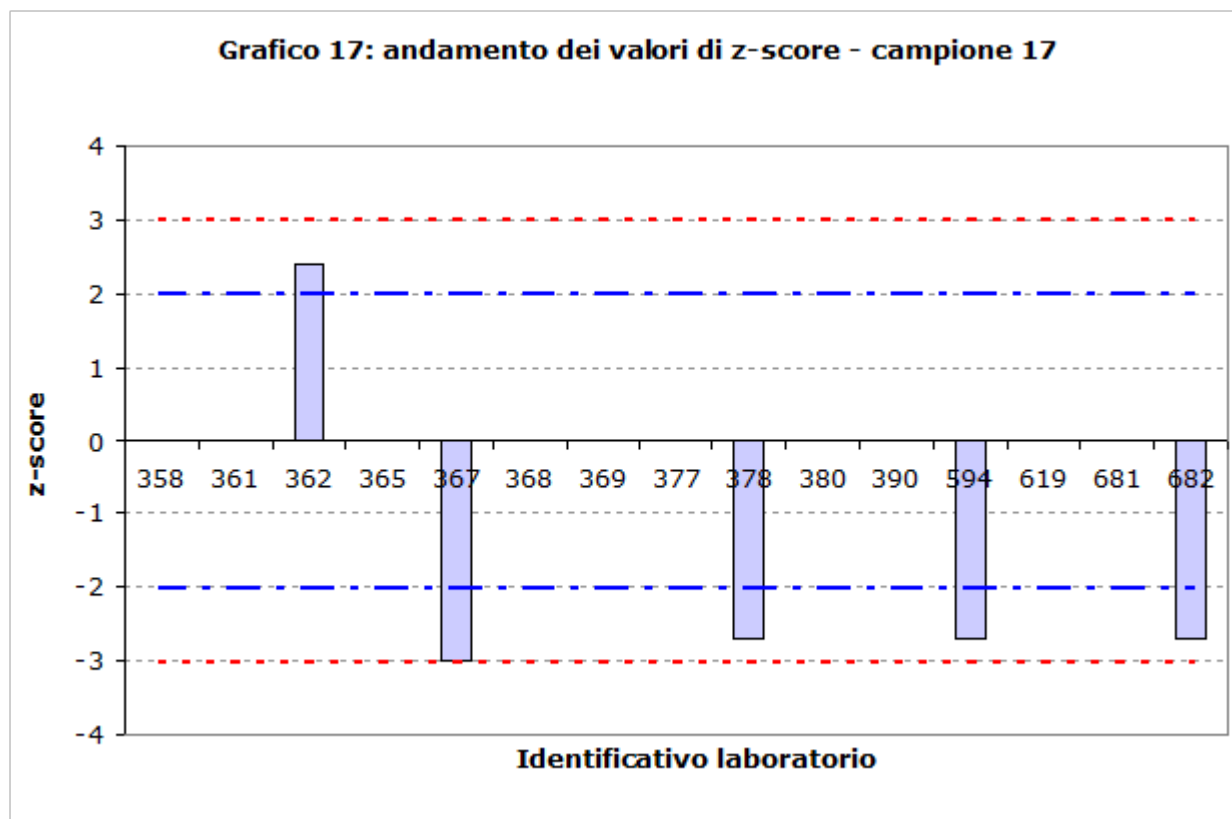
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



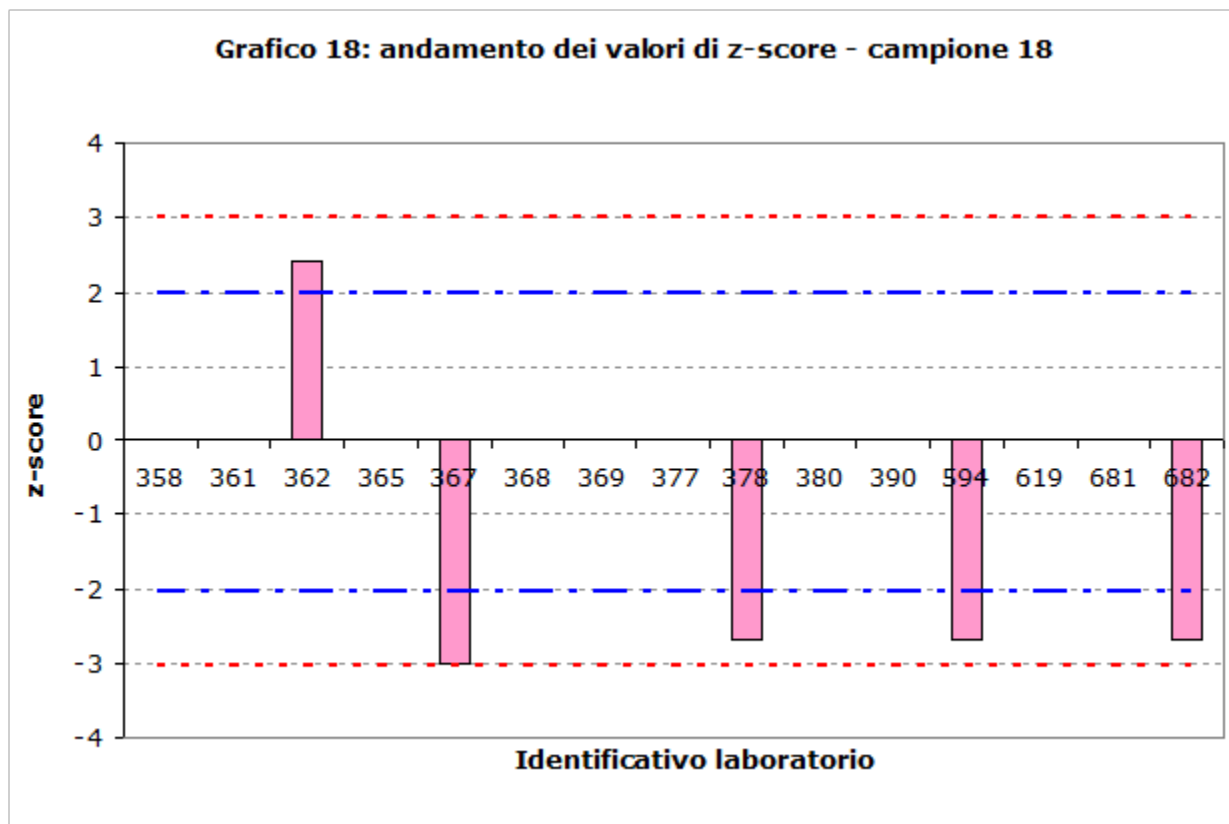
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



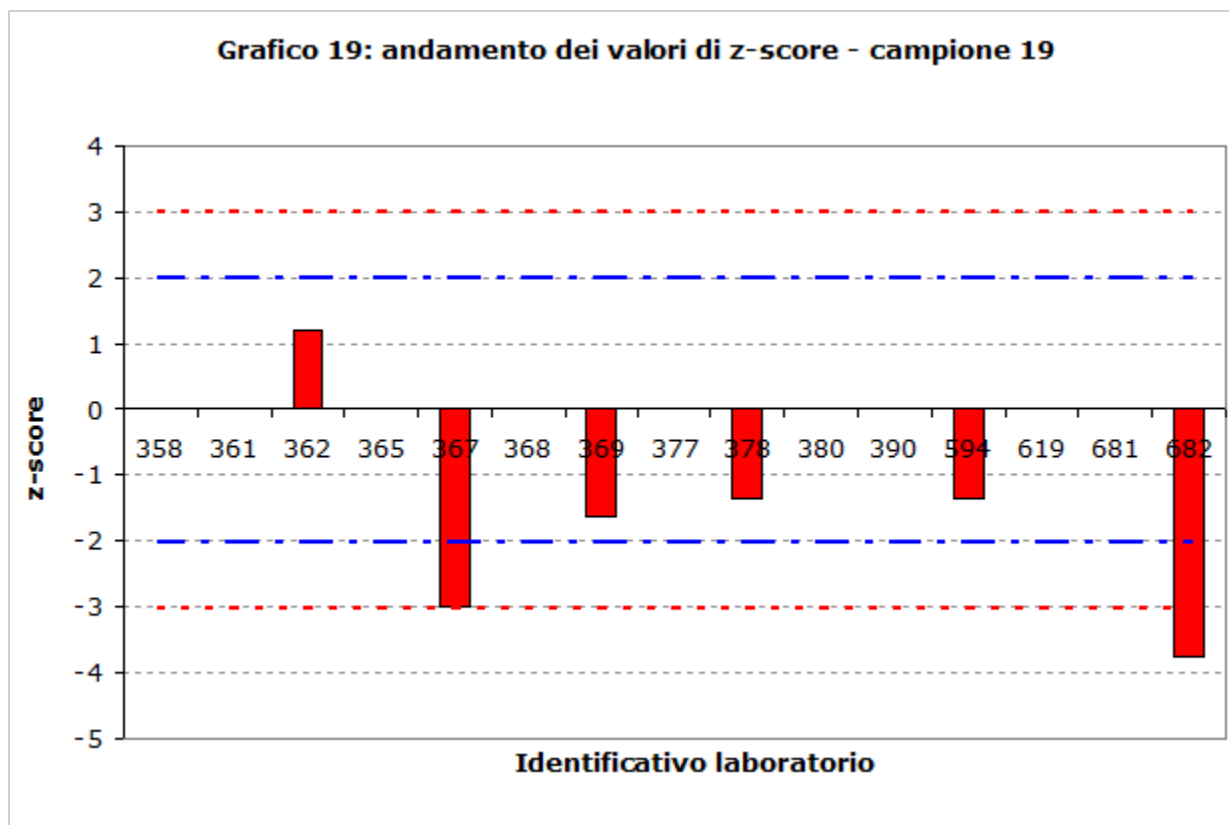
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



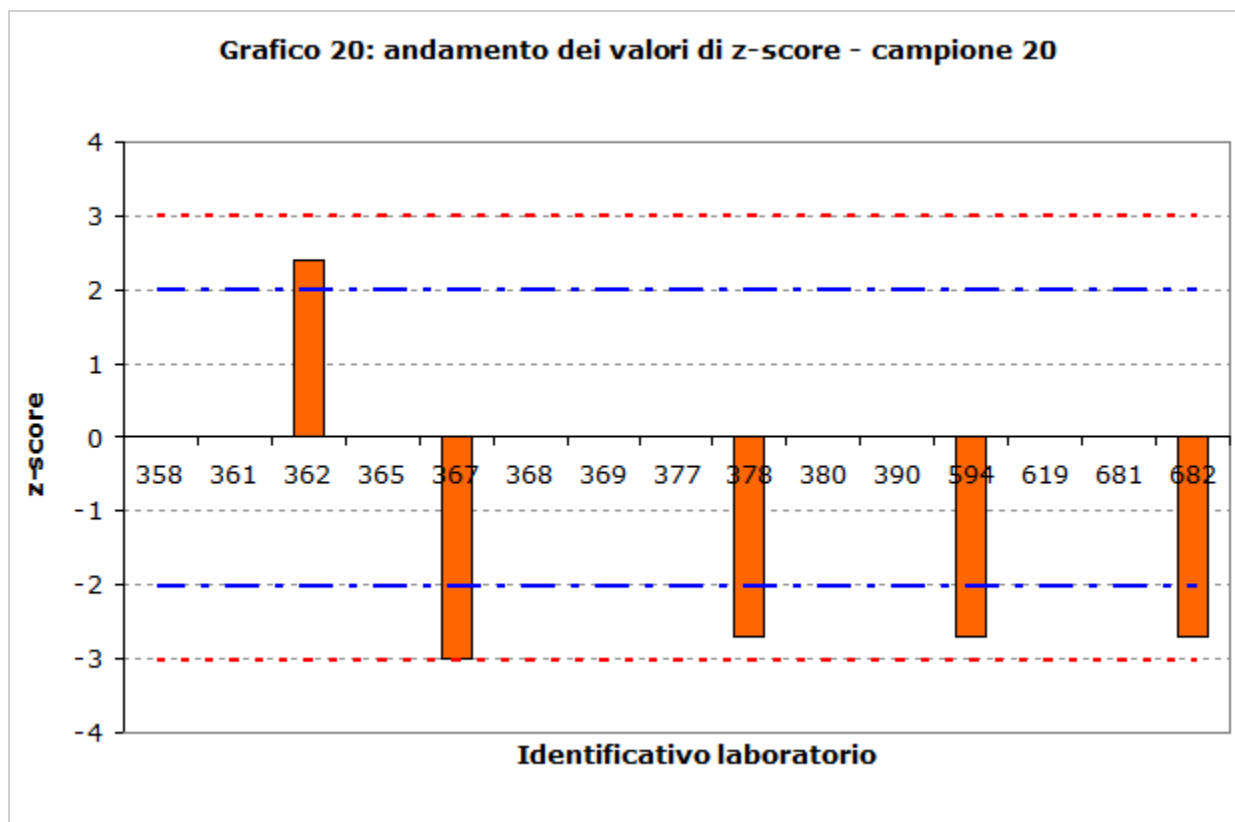
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

Grafici z-score



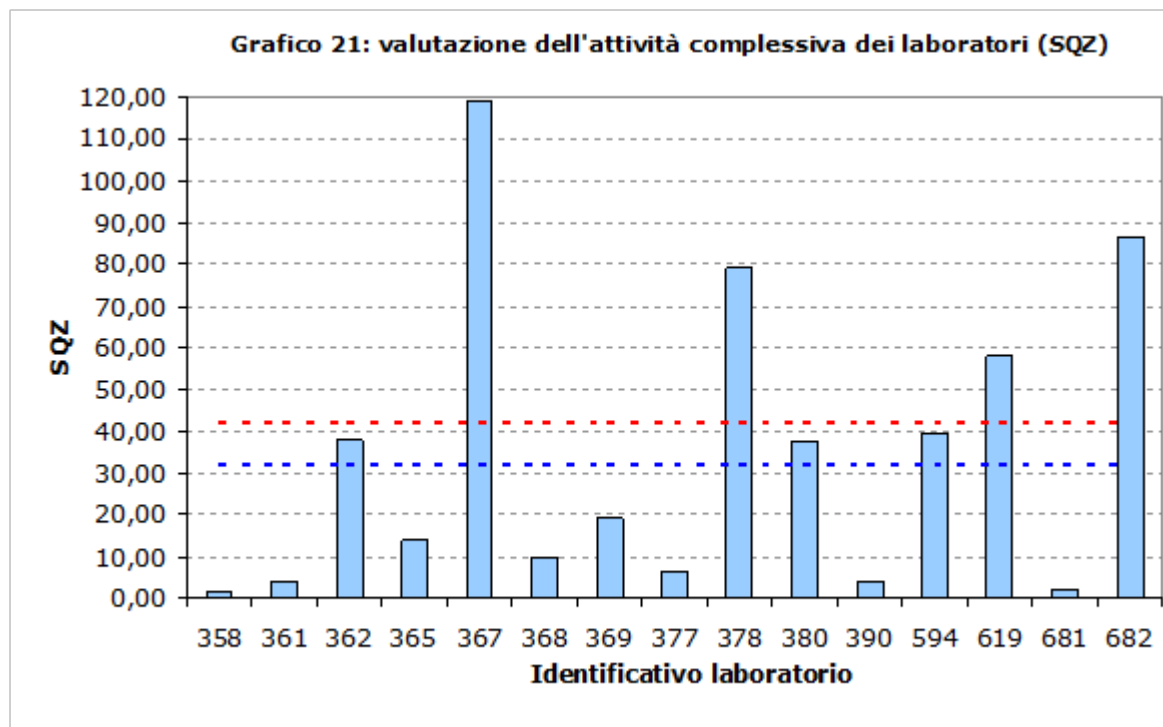
$ z \leq 2$	soddisfacente
$2 < z < 3$	discutibile
$ z \geq 3$	insoddisfacente

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

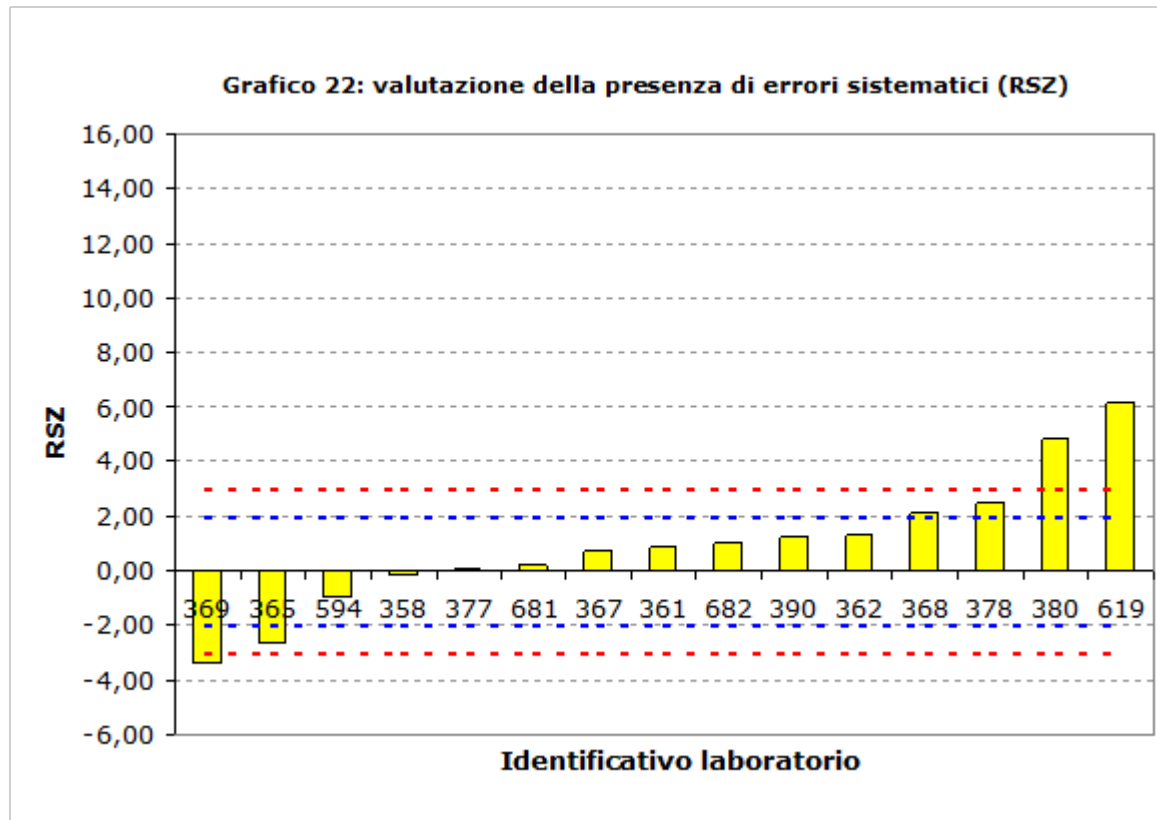
$SQZ (\alpha = 0,0455; n) \leq SQZ_{lab} \leq SQZ (\alpha = 0,0027; n)$

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	20	0	86,7%	100%
361	20	20	0	86,7%	100%
362	20	20	0	86,7%	100%
365	20	20	0	86,7%	100%
367	20	19	1	76,2%	98,8%
368	20	20	0	86,7%	100%
369	20	20	0	86,7%	100%
377	20	20	0	86,7%	100%
378	20	20	0	86,7%	100%
380	20	20	0	86,7%	100%
390	20	20	0	86,7%	100%
594	20	20	0	86,7%	100%
619	20	20	0	86,7%	100%
681	20	20	0	86,7%	100%
682	20	18	2	69,6%	97,0%

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

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

Prestazione globale (SQZ) ed errori sistematici (RSZ)

- Prestazione globale (SQZ): soddisfacente per 8 laboratori, discutibile per i laboratori **362**, **380** e **594** mentre insoddisfacente per i laboratori **367**, **378**, **619** e **682**
- Errori sistematici (RSZ): risultati soddisfacenti per 9 laboratori, discutibili per i laboratori **365**, **368** e **378**, insoddisfacenti per i laboratori **369**, **380** e **619**

Risultati real time RT-PCR

- Utilizzando il metodo real time RT-PCR, 13 laboratori su 15 hanno correttamente individuato i campioni del pannello in esame

Risultati non corretti:

- Ceppo BTV24 (laboratorio **367**, campione n° **236**, $10^{2.9}$ TCID₅₀/ml)
- Ceppo BTV9 (laboratorio **682**, campione n° **16**, $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml)
- Campione negativo per BTV identificato positivo (laboratorio **682**, campione n° **97**)

Risultati test qualitativo: Stima percentuale risultati corretti

Identificativo laboratorio	esaminati	corretti	errati	I.c.i. 95%	I.c.s. 95%
362	20	20	0	86,7%	100%
368	20	18	2	69,6%	97%
378	20	20	0	86,7%	100%
390	20	20	0	86,7%	100%
594	20	17	3	63,7%	95%
682	20	16	4	58,1%	92%

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

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

Risultati test qualitativo

- Utilizzando il metodo RT-PCR, 3 laboratori su 6 hanno correttamente individuato i campioni del pannello in esame

Risultati non corretti:

- Laboratorio **368** (BTV9: campione n° **90**, $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml; campione n° **113**, $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml)
- Laboratorio **594** (BTV9: campione n° **121**, $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml; campione n° **172**, $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml e campione n° **205**, $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)
- Laboratorio **682** (BTV8: campione n° **229**, $10^{3.2}$ TCID₅₀/ml. BTV9: campione n° **16**, $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml. BTV16: campione n° **224**, $10^{3.3}$ TCID₅₀/ml. Campione negativo n° **97** identificato positivo)



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



Reference Laboratory
Bluetongue

Grazie