



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

**Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi**  
**Via A. Bianchi, 9 – 25124 Brescia BS**  
TEL. 030 2290268 TELEFAX 030 2290570

## REPORT DEL RING TEST per la ricerca di LEPTOSPIRE PATOGENE IN CAMPIONI BIOLOGICI TRAMITE PCR

### DISTRIBUZIONE (ROUND): 01/2012

Ente organizzatore: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia dell'Emilia Romagna  
Centro di Referenza nazionale per la Leptospirosi  
Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA

Coordinatore del ring test: Dr.ssa Silvia Tagliabue  
[silvia.tagliabue@izsler.it](mailto:silvia.tagliabue@izsler.it)  
Tel. 030 2290268  
Fax 0302290570

Esperto tecnico: Dr.ssa Beatrice Boniotti  
[mariabeatrice.boniotti@izsler.it](mailto:mariabeatrice.boniotti@izsler.it)  
Tel. 030 2290273

Esperti Statistici: Dr. Marco Tamba, Dr. Giorgio Galletti  
[marco.tamba@izsler.it](mailto:marco.tamba@izsler.it),  
[giorgio.galletti@izsler.it](mailto:giorgio.galletti@izsler.it)  
Tel. 051 4200032

Assicurazione qualità: Dr. Antonio Petteni  
[raq@izsler.it](mailto:raq@izsler.it)  
Tel. 030 2290237

Collaboratori tecnici: Sig. Arturo Scalvenzi, Sig.ra Anna Mangeli

## INDICE

1 Introduzione	3
2 Materiali e metodi	3
2.1. Campioni	3
2.2. Preparazione	3
2.3. Distribuzione	4
3. Analisi statistica	4
4. Riservatezza	4
5. Presentazione dei risultati	5
5.1. Prove di omogeneità e di stabilità	5
5.2. Metodiche utilizzate dai laboratori partecipanti	5
5.3. Campioni di sangue	6
5.4. Campioni di DNA	7
5.5. Risultati delle PCR Real Time comprensivi dei valori Ct	8
6. Conclusioni	9

## 1. Introduzione

L'adesione al ring test di ricerca delle Leptospire patogene tramite PCR è stata proposta il 28/09/2012 ai Direttori di tutti gli Istituti Zooprofilattici con lettera di invito prot. 23226, con la quale si richiedeva la conferma di adesione per posta elettronica da parte di tutti i Referenti della metodica dei laboratori IZZSS che eseguono la prova.

I laboratori che hanno aderito alla prova valutativa sono stati 11, di cui 7 appartenenti a 7 diversi Istituti Zooprofilattici (adesioni e defezioni ricevute dal 03/10/2012 al 29/10/2012) e 4 appartenenti all'Istituto organizzatore.

I campioni sono stati inviati: il 06/11/2012 ai laboratori appartenenti a Istituti diversi dall'organizzatore, accompagnati da lettera prot. 26288 del 02/11/2012 e dalla Scheda di Istruzioni (Protocollo Operativo e Scheda di Registrazione dei Risultati IZZSS); il 13/11/2012 a Pavia e il 14/11/2012 a Modena e a Parma, accompagnati dalla Scheda di Istruzioni (Protocollo Operativo e Scheda di Registrazione dei Risultati IZSLER).

Ciascun laboratorio partecipante ha ricevuto 6 campioni di sangue bovino e 6 campioni costituiti da DNA estratto dagli stessi campioni di sangue, da analizzare con le metodiche PCR utilizzate per la diagnosi di Leptospirosi.

Il termine per l'invio dei risultati è stato fissato al 30/11/2012.

I risultati del ring test sono stati anticipati il 14/12/2012 al convegno "Attività diagnostica leptospirosi presso il Centro di riferimento e gli Istituti Zooprofilattici" organizzato dal CRNL, a cui sono stati invitati tutti gli Istituti Zooprofilattici (invito e-mail del 26/07/2012; invio verbale del 10/01/2013) e le tre Sezioni partecipanti (e-mail del 26/11/2012)

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 Campioni

Il pannello di campioni da analizzare comprendeva 6 campioni di sangue bovino (4 positivi, 2 negativi) e 6 campioni di DNA estratto dagli stessi campioni di sangue (4 positivi, 2 negativi). I campioni positivi sono stati contaminati artificialmente con diverso numero di copie genomiche di *L. borgpetersenii* sierovariante Tarassovi (Tabella 1):

Tabella 1. Composizione campioni

Campione	Esito atteso
S 10 <sup>7</sup> L./ml	Positivo
S 10 <sup>6</sup> L./ml	Positivo
S 10 <sup>5</sup> L./ml	Positivo
S 5x10 <sup>4</sup> L./ml	Positivo
S Neg	Negativo
S Neg	Negativo

Campione	Esito atteso
D 10 <sup>7</sup> L./ml	Positivo
D 10 <sup>6</sup> L./ml	Positivo
D 10 <sup>5</sup> L./ml	Positivo
D 5x10 <sup>4</sup> L./ml	Positivo
D Neg	Negativo
D Neg	Negativo

S: sangue

D: DNA

### 2.2 Preparazione

Ogni pannello di campioni inviato ai singoli laboratori è stato codificato con un codice alfanumerico composto da una prima lettera che individua la natura del campione, S o D, da una seconda lettera che individua il laboratorio e da un numero che individua il campione come da Tabella 2.

Tabella 2 – Decodifica dei campioni

Campione	Stato del campione	Identificativo laboratorio										
		A	B	C	D	E	F	H	I	M	N	O
<b>S 10<sup>7</sup> L./ml</b>	Positivo	A 1	B 2	C 3	D 4	E 5	F 6	H 8	I 9	M 11	N 12	O 1
<b>S 10<sup>6</sup> L./ml</b>	Positivo	A 2	B 3	C 4	D 5	E 6	F 7	H 9	I 10	M 12	N 1	O 2
<b>S 10<sup>5</sup> L./ml</b>	Positivo	A 3	B 4	C 5	D 6	E 7	F 8	H 10	I 11	M 1	N 2	O 3
<b>S 5x10<sup>4</sup> L./ml</b>	Positivo	A 4	B 5	C 6	D 7	E 8	F 9	H 11	I 12	M 2	N 3	O 4
<b>S Neg</b>	Negativo	A 5	B 6	C 7	D 8	E 9	F 10	H 12	I 1	M 3	N 4	O 5
<b>S Neg</b>	Negativo	A 6	B 7	C 8	D 9	E 10	F 11	H 1	I 2	M 4	N 5	O 6
<b>D 10<sup>7</sup> L./ml</b>	Positivo	A 7	B 8	C 9	D 10	E 11	F 12	H 2	I 3	M 5	N 6	O 7
<b>D 10<sup>6</sup> L./ml</b>	Positivo	A 8	B 9	C 10	D 11	E 12	F 1	H 3	I 4	M 6	N 7	O 8
<b>D 10<sup>5</sup> L./ml</b>	Positivo	A 9	B 10	C 11	D 12	E 1	F 2	H 4	I 5	M 7	N 8	O 9
<b>D 5x10<sup>4</sup> L./ml</b>	Positivo	A 10	B 11	C 12	D 1	E 2	F 3	H 5	I 6	M 8	N 9	O 10
<b>D Neg</b>	Negativo	A 11	B 12	C 1	D 2	E 3	F 4	H 6	I 7	M 9	N 10	O 11
<b>D Neg</b>	Negativo	A 12	B 1	C 2	D 3	E 4	F 5	H 7	I 8	M 10	N 11	O 12

### 2.3 Distribuzione

I laboratori appartenenti a Istituti diversi dall'organizzatore sono stati avvisati dell'invio dei campioni mediante posta elettronica il 30/10/2012.

I campioni sono stati inviati congelati in ghiaccio secco mediante corriere.

I laboratori appartenenti all'Istituto organizzatore sono stati avvisati dell'invio dei campioni mediante posta elettronica il 06/11/2012.

I campioni sono stati inviati congelati in ghiaccio secco mediante il servizio di collegamento IZSLER.

A tutti i laboratori partecipanti è stato richiesto di comunicare mediante posta elettronica l'arrivo dei campioni presso il laboratorio. L'arrivo era previsto entro 2-3 giorni dalla spedizione. I campioni sono pervenuti a tutti i laboratori entro 2 giorni dalla spedizione.

### 3. Analisi statistica

Ai fini della valutazione statistica, i risultati delle prove condotte sui singoli campioni sono stati classificati come corretti quando conformi al risultato atteso. Sono state considerate due categorie di risultati: "Negativo" e "Positivo".

L'analisi statistica dei dati ha teso primariamente a calcolare l'accuratezza dei risultati prodotti da ciascun laboratorio, attraverso il calcolo di Sensibilità (Se), Specificità (Sp), indice di accuratezza (proporzione di risultati corretti) e indice di Youden ( $J = Se + Sp - 1$ ). Per Se, Sp e accuratezza gli indici fiduciali sono stati calcolati con il metodo binomiale, utilizzando il software R.

Quando il medesimo laboratorio ha utilizzato più di un metodo, gli indici sono stati calcolati valutando separatamente i risultati prodotti dai diversi metodi. Quando un laboratorio ha refertato il campione come "inibito" (PCR), la prova non è stata considerata nell'elaborazione.

I risultati delle prove eseguite sui campioni di sangue e sugli estratti di DNA sono state considerate separatamente.

### 4. Riservatezza

Per garantire la riservatezza dei dati, i laboratori sono stati identificati mediante un codice, che è stato utilizzato per tutte le comunicazioni riguardanti il laboratorio stesso.

I dati, trattati in forma confidenziale e riservata, vengono utilizzati dall'Ente organizzatore del ring test esclusivamente per l'analisi e la valutazione dei risultati.

## 5. Presentazione dei risultati

### 5.1 Prove di Omogeneità e Stabilità

Dopo suddivisione di ogni campione in aliquote, da 0,5 ml il sangue (S) e 50 µl il DNA (D) e congelamento a - 20 °C, al fine di valutarne l'omogeneità prima dell'invio, è stata eseguita una prova in duplicato a partire da due aliquote (pre-prova) presso il CRNL da parte dello stesso operatore (Darwin 2012/297388/finalità controlli interni): l'omogeneità è stata valutata favorevolmente per confronto tra gli esiti ottenuti con le due aliquote (t test per dati appaiati,  $p > 0.05$ ).

Al fine di valutare la stabilità dei campioni il CRNL ha eseguito la prova di ring test con il metodo in uso presso il CR (MP09/164) dopo che tutte le Strutture partecipanti hanno concluso la loro prova (post-prova): la stabilità è stata valutata per confronto fra i risultati ottenuti nella pre-prova e nella post-prova (t test per dati appaiati,  $p > 0.05$ ) (Tabella 3).

Tabella 3. Risultati omogeneità e stabilità

	Omogeneità 1° aliquota	Omogeneità 2° aliquota	Stabilità post-prova
	lipL32	lipL32	lipL32
S 10 <sup>7</sup>	24,16	24,49	24,01
	24,16	24,72	23,7
S 10 <sup>6</sup>	26,76	27,1	28,44
	26,72	27,08	28,14
S 10 <sup>5</sup>	30,55	31,11	31,58
	//NEG	31,12	31,22
S 5x10 <sup>4</sup>	32,78	31,28	32,87
	32,35	31,59	33,07
S Neg	NEG	NEG	NEG
	NEG	NEG	NEG
D 10 <sup>7</sup>	23,52	23,56	23,24
	23,78	23,73	23,1
D 10 <sup>6</sup>	27,26	27,32	26,57
	27,28	27,56	26,66
D 10 <sup>5</sup>	31,92	31,7	31
	31,64	31,94	30,65
D 5x10 <sup>4</sup>	32,88	33,76	34,09
	33,56	33,12	34,39
D Neg	NEG	NEG	NEG
	NEG	NEG	NEG

### 5.2 Metodiche utilizzate dai laboratori partecipanti

Le metodiche utilizzate per l'estrazione di DNA sono riassunte in Tabella 4 mentre quelle utilizzate nei protocolli PCR sono riassunte nella Tabella 5.

Tabella 4. Metodi di estrazione

Laboratorio	Estrazione:
A	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)
B	Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega).
C	QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen)
D	High Pure PCR Template Preparation kit (Roche)
E	QIAamp cadof Pathogen Mini kit (Qiagen)
F	QIAMP DNA MINI KIT (Qiagen)
H	QIAMP DNA MINI KIT (Qiagen)
I	DNeasy Blood Tissue Kit
M	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)
N	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)
O	PureLink Genomic DNA (Invitrogen)

Tabella 5. Metodi di rilevamento

Lab.	Tipologia di PCR	Metodo	Soglia di positività	Target	Validazione	Controllo interno estrazione/amplificazione
A	Real-Time (TaqMan)	in house	Ct ≤40	lipL32	sì	si/sì
B	Real-Time (TaqMan)	in house	Ct 40	lipL32	no	no/no
C	Real-Time (TaqMan)	Kit Adiavet	Ct 40	hap1	no	no/sì
D1	Real-Time (TaqMan)	in house	15>Ct<38	rrs (16S)	sì	no/no
D2	End-point	in house	/	lipL32	sì	no/no
E	Real-Time (TaqMan)	in house	Ct ≤40	secY	sì	no/no
F	End-point	in house	/	rrs2	sì	no/no
H	Real-Time (TaqMan)	in house	LOD: 1GE/μl	lipL32	no	no/sì
I	End-point	in house	/	rrs	no	no/sì
M	Real-Time (TaqMan)	in house	Ct ≤40	lipL32	sì	si/sì
N	Real-Time (TaqMan)	in house	Ct ≤40	lipL32	sì	si/sì
O	Real-Time (TaqMan)	in house	Ct ≤40	lipL32	sì	si/sì

### 5.3 Campioni di sangue

Sono pervenuti risultati da 11 laboratori appartenenti a 8 diversi IZZSS. I risultati delle prove sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6 – PCR: Risultati pervenuti dai Laboratori partecipanti

Campione	Metodo Risultato atteso	Identificativo laboratorio											
		A	B	C	D		E	F	H	I	M	N	O
		RT	RT	RT	EP	RT	RT	EP	RT	EP	RT	RT	RT
S 10 <sup>7</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
S 10 <sup>6</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
S 10 <sup>5</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
S 5x10 <sup>4</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
S Neg	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S Neg	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D 10 <sup>7</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D 10 <sup>6</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D 10 <sup>5</sup>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P
D 5x10 <sup>4</sup>	P	P	P	P	N	P	P	N	P	N	P	P	P
D Neg	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D Neg	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Legenda metodiche:

EP: PCR end point

RT: PCR real time



Risultato falso negativo

### Accuratezza

In Tabella 7 sono stati riportati i livelli di accuratezza, Sensibilità (Se), Specificità (Sp) e l'indice di Youden (J) riscontrati nella prova PCR eseguita sul sangue.

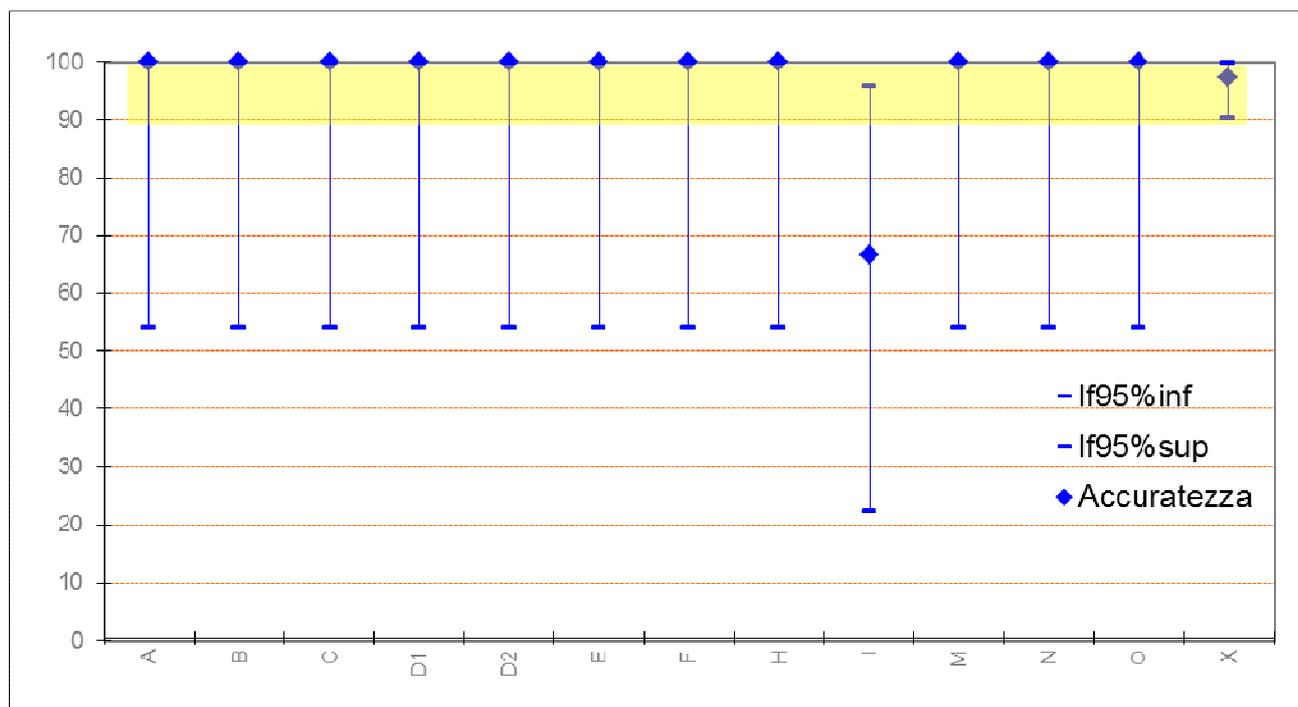
Complessivamente è stato classificato correttamente il **97,2%** dei campioni esaminati.

Dall'analisi della Tabella 6 si rileva che un laboratorio (I) non ha individuato tutti i campioni contaminati, mostrando così un'accuratezza della prova inferiore alla media (Fig. 1).

Tab. 7 – Diagnosi mediante PCR su campioni di sangue. Sensibilità, Specificità, Indice J di Youden registrate nella prova

Lab	P/P Attesi	Se	L.f. 95% della Se		N/N Attesi	Sp	L.f. 95% della Sp		J	Accuratezza	L.f. 95% Accuratezza	
A	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
B	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
C	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
D1	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
D2	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
E	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
F	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
H	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
I	2/4	0,500	0,068	0,932	2/2	1,000	0,158	1,000	0,500	0,667	0,223	0,957
M	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
N	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
O	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
<b>Media</b>	<b>46/48</b>	<b>0,958</b>	<b>0,857</b>	<b>0,995</b>	<b>24/24</b>	<b>1,000</b>	<b>0,858</b>	<b>1,000</b>	<b>0,958</b>	<b>0,972</b>	<b>0,903</b>	<b>0,997</b>

Fig. 1 – Valori di accuratezza della PCR stimati



D1: PCR end point  
D2: PCR real time

#### 5.4 Campioni di DNA

Sono pervenuti risultati da 11 laboratori appartenenti a 8 diversi IIZZSS. I risultati delle prove sono riportati in Tabella 6.

#### Accuratezza

In Tabella 8 sono stati riportati i livelli di accuratezza, Sensibilità (Se), Specificità (Sp) e l'indice di Youden (Y) riscontrati nella prova PCR eseguita sugli estratti di DNA.

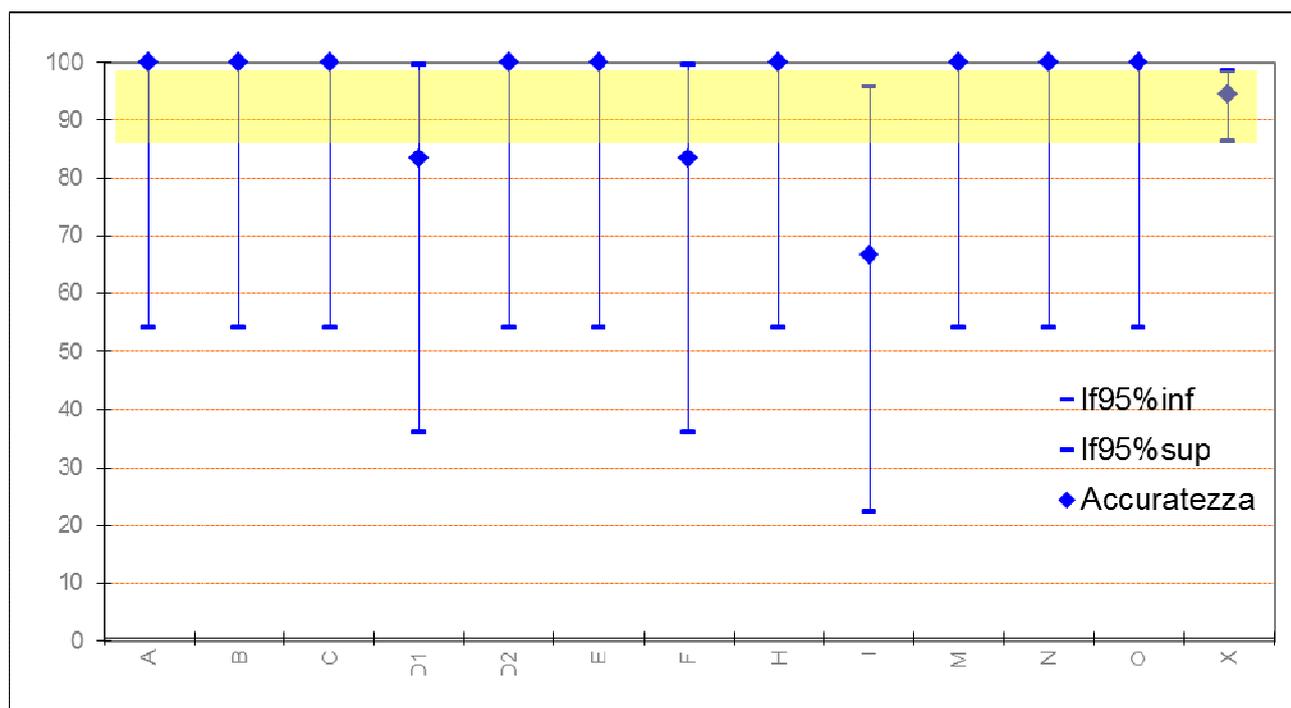
Complessivamente è stato classificato correttamente il **94,4%** dei campioni esaminati.

Dall'analisi della Tabella 6 si rileva che tre laboratori (D1, I, F) non hanno individuato tutti i campioni contaminati, mostrando così un'accuratezza della prova inferiore alla media (Fig. 2).

Tab. 8 – Diagnosi mediante PCR su campioni di estratto di DNA. Sensibilità, Specificità, Indice J di Youden ed registrate nella prova

Lab	P/P Attesi	Se	L.f. 95% della Se		N/N Attesi	Sp	L.f. 95% della Sp		J	Accuratezza	L.f. 95% Accuratezza	
A	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
B	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
C	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
D1	3/4	0,750	0,194	0,994	2/2	1,000	0,158	1,000	0,750	0,833	0,359	0,996
D2	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
E	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
F	3/4	0,750	0,194	0,994	2/2	1,000	0,158	1,000	0,750	0,833	0,359	0,996
H	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
I	2/4	0,500	0,068	0,932	2/2	1,000	0,158	1,000	0,500	0,667	0,223	0,957
M	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
N	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
O	4/4	1,000	0,398	1,000	2/2	1,000	0,158	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000
Media	44/48	0,917	0,800	0,977	24/24	1,000	0,858	1,000	0,917	0,944	0,864	0,985

Fig. 2 – Valori di accuratezza della PCR stimati



D1: PCR end point  
D2: PCR real time

### 5.5 Risultati delle PCR Real Time comprensivi dei valori Ct

Nonostante le performance dei laboratori siano state valutate esclusivamente basandosi sul risultato qualitativo, vengono riportati a titolo puramente informativo i valori di Ct ottenuti nelle metodiche Real Time dai singoli laboratori (Tabella 9).

Tabella 9. Valori Ct delle metodiche PCR Real Time.

IZS	A	B	C	D	E	H	M	N	O
<b>S 10<sup>7</sup></b>	23,86	21,5	25,34	25,83	29	25,38	23	22	26
<b>S 10<sup>6</sup></b>	28,29	25	29,36	28,07	33	28,27	26	26,4	29
<b>S 10<sup>5</sup></b>	31,4	29	32,58	34,35	37	32,96	30,5	30	33
<b>S 5x10<sup>4</sup></b>	32,97	30	33,65	35,90	40	33,75	32	31,6	34
<b>S Neg</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>S Neg</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>D 10<sup>7</sup></b>	23,17	25,5	25,72	26,22	29	25,85	23	23,6	25
<b>D 10<sup>6</sup></b>	26,62	26	29,09	27,65	35	28,80	26,5	28,8	29
<b>D 10<sup>5</sup></b>	30,83	30	32,7	32,90	37	34,33	30,5	31	33
<b>D 5x10<sup>4</sup></b>	34,24	36	34,96	34,43	37	34,65	31	32,6	35
<b>D Neg</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>D Neg</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

I valori di Ct sono generalmente omogenei tra loro con l'eccezione dei risultati del laboratorio E sistematicamente più elevati rispetto agli altri laboratori. Inoltre lo stesso laboratorio ha ottenuto un risultato al limite della positività per quanto riguarda la diluizione S 5x10<sup>4</sup>.

## 6. Conclusioni

Complessivamente la prova valutativa ha mostrato un risultato soddisfacente e piuttosto omogeneo tra i partecipanti. La maggior parte delle differenze sono attribuibili alla sensibilità dei metodi utilizzati, infatti i tre laboratori che hanno utilizzato la metodica di PCR end-point hanno ottenuto esiti falsamente negativi sui campioni meno contaminati. Si evidenzia che le metodiche di PCR Real Time sono risultate più sensibili di quelle end-point.

I laboratori che non hanno rilevato correttamente il pannello dei campioni inviati, sono invitati ad intraprendere azioni correttive atte a risolvere la non conformità derivante dall'errato risultato.