



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

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

REPORT FINALE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO

TEST SIEROLOGICO AGGLUTINAZIONE MICROSCOPICA (MAT) LEPTOSPIROSI

DISTRIBUZIONE 2010

Ente organizzatore: Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna

Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi (CRNL)

Via Bianchi, 9

25124 Brescia

Coordinatore del ring test e esperto tecnico: Dr. ssa Silvia Tagliabue

silvia.tagliabue@izsler.it

Tel. 030 2290268

Fax 030 2290570

Elaborazione statistica a cura di: Dr.ssa Claudia Nassuato

claudia.nassuato@izsler.it

Tel. 030 2290635



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

"BRUNO UBERTINI"

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

INDICE

INTRODUZIONE	3
RISERVATEZZA.....	3
OBIETTIVI.....	3
MATERIALI E METODI.....	4
CAMPIONI.....	4
PREPARAZIONE.....	4
OMOGENEITÀ/STABILITÀ.....	4
DISTRIBUZIONE.....	4
PROVA.....	5
RISULTATI.....	5
ANALISI STATISTICA E VALUTAZIONE DEI RISULTATI.....	7
ESITO QUALITATIVO - DIAGNOSI DI SIEROGRUPPO	7
PARAMETRI DI ACCETTABILITA' DEI RISULTATI.....	7
CORRETTEZZA DELL'ESITO.....	7
RIPETIBILITÀ (ACCORDANZA) E RIPRODUCIBILITÀ (CONCORDANZA)	7
ESITO QUANTITATIVO –TITOLO SIEROLOGICO.....	8
PREMESSA.....	8
IDENTIFICAZIONE DEI VALORI ANOMALI.....	8
DISCUSSIONE.....	11
DIAGNOSI DI SIEROGRUPPO	11
LIVELLO DEI TITOLI POSITIVI	12
CEPPI IN USO E TITOLO SOGLIA PRESSO I LABORATORI PARTECIPANTI... ..	13
CONCLUSIONI.....	13



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

INTRODUZIONE

Nel mese di novembre 2010 il coordinatore del ring-test ha inviato un invito di partecipazione al circuito interlaboratorio relativo alla diagnosi sierologica di leptospirosi mediante agglutinazione microscopica MAT ai Direttori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (prot. 33679 del 19/11/2011) ed ha richiesto ai Referenti della metodica la conferma di adesione mediante comunicazione per posta elettronica.

L'adesione è pervenuta da 10 laboratori, compreso il laboratorio organizzatore del ring test.

I campioni, preceduti da una mail informativa ai Referenti della metodica (06/12/2010), sono stati inviati il 13 dicembre 2010 (Documento di Accompagnamento prot. 35856 del 09/12/2010); il Protocollo Operativo e la Scheda di Registrazione dei Risultati, personalizzati con il Codice identificativo della Struttura partecipante, sono stati trasmessi per via informatica nella stessa data.

Il Report di presentazione e di valutazione dei risultati pervenuti entro la data prevista (31/01/2011) verrà inviato ai Referenti della metodica degli Istituti partecipanti e, per conoscenza, al Ministero e all'Istituto Superiore di Sanità, oltre che alla Direzione Generale e Sanitaria e al RAQ dell'Istituto organizzatore.

RISERVATEZZA

Per garantire la riservatezza dei dati, le Strutture partecipanti sono state identificate mediante un codice alfanumerico univoco, che viene utilizzato per tutte le comunicazioni riguardanti le strutture stesse.

I dati, trattati in forma riservata, vengono utilizzati dalla Struttura organizzatrice esclusivamente per l'analisi e la valutazione dei risultati. La correlazione Codice – Laboratorio è nota solo al laboratorio e all'Ente organizzatore del ring test.

OBIETTIVI

Dare ai partecipanti informazioni sulla qualità della loro prova MAT al fine del miglioramento e dell'uniformità della prestazione.

- 1) Determinare se i partecipanti identificano correttamente un campione di siero come sierologicamente positivo o negativo per *Leptospira interrogans s.l.*
- 2) Determinare se i partecipanti identificano correttamente, con specificità di sierogruppo, anticorpi in campioni di siero.
- 3) Comparare i titoli sierologici ottenuti dai diversi partecipanti sugli stessi campioni di siero positivi.



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

MATERIALI E METODI

CAMPIONI

Ciascun laboratorio partecipante ha ricevuto 5 campioni liofilizzati di siero di sangue identificati singolarmente con codice numerico (numero progressivo da 1 a 5), da analizzare con la metodica di agglutinazione microscopica MAT.

PREPARAZIONE

I campioni da sottoporre a prova sono stati allestiti a partire da sieri di campo di varia specie animale, sottoposti in precedenza al Metodo di Prova accreditato "Diagnosi di leptospirosi mediante agglutinazione microscopica MAT" (MP 04/019) nell'ambito della routine diagnostica, congelati.

Sono state allestite delle miscele di siero per raggiungere il volume necessario. Onde limitare le reazioni crociate, le miscele di sieri 4 e 5 sono state diluite 1/2 in siero negativo. Le miscele finali sono state quindi aliquotate in ragione di 0,5 ml, liofilizzate e controllate dopo liofilizzazione con lo stesso metodo.

I risultati delle prove preliminari eseguite sui campioni dal laboratorio organizzatore sono indicati in Tabella 1. Il sierogruppo attribuito è quello risultato a titolo più elevato.

Tabella 1: Risultati delle prove preliminari a cui sono stati sottoposti i campioni

Campione	Sierogruppo
1	Sejroe
2	Australis
3	campione negativo
4	Pomona
5	Icterohaemorrhagiae

OMOGENEITÀ/STABILITÀ

Al fine di valutare l'omogeneità e la stabilità ai fini del trasporto dei campioni è stata eseguita una prova presso il CRNL da parte dello stesso operatore, in due repliche in tempi differenziati: l'omogeneità è stata valutata favorevolmente per confronto tra le due repliche; la stabilità è stata valutata favorevolmente per confronto fra i risultati ottenuti in due prove eseguite a distanza di oltre un anno, periodo durante il quale i campioni sono stati conservati refrigerati (5 ± 3 °C) allo stato liofilo. Non è stato possibile invece procedere alla valutazione della stabilità delle miscele ricostituite in condizioni di refrigerazione per insufficienza di materiale.

DISTRIBUZIONE

I campioni liofilizzati sono stati inviati refrigerati (5 ± 3 °C) tramite corriere, in un unico invio, annunciato sette giorni prima ai destinatari.

Le conferme di ricezione sono datate 14-17/12/2010.



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

PROVA

Ai partecipanti è stato chiesto di sottoporre i campioni al test sierologico di agglutinazione microscopica (MAT) per diagnosi di leptospirosi secondo la procedura tecnica seguita routinariamente, partendo dalla diluizione finale dei campioni 1/100 (dopo l'aggiunta al campione diluito 1/50 di pari volume di antigene).

Le istruzioni contenute nel Protocollo Operativo prevedevano per ogni flacone ricevuto per ognuno dei 5 campioni la ricostituzione con 0,5 ml di acqua distillata sterile. Era previsto che l'operatore eseguisse due repliche in identiche condizioni, a breve distanza di tempo nella prima giornata (fase di screening) e nella seconda giornata (fase di titolazione), rifacendo, per ognuna delle due repliche, a partire dal campione ricostituito, la diluizione d'uso 1/50 in soluzione fisiologica sterile nella quantità necessaria per l'esecuzione della prova. Si raccomandava di tenere refrigerate le prediluizioni tra un giorno e l'altro. Per eventuali ulteriori ripetizioni della prova era previsto il congelamento del quantitativo residuo dei campioni ricostituiti.

I titoli, ottenuti per diluizioni in base 2 dei sieri, sono espressi come il reciproco della diluizione.

In questo ring test un campione è stato considerato:

- negativo: per titoli minori di 100 a qualsiasi sierovariante
- positivo: per titoli maggiori o uguali a 100 con qualsiasi sierovariante
- positivo per un sierogruppo (evidenziato in grassetto in Tabella 2): definito dal titolo più elevato.

La scelta del titolo soglia 100 è un criterio arbitrario di attribuzione del sierogruppo, che non implica che un titolo di 100 debba essere considerato diagnostico.

RISULTATI

Sono pervenuti risultati da 9 dei 10 Istituti Zooprofilattici aderenti al circuito.

Il CRNL ha eseguito la prova di ring test insieme agli altri IZZSS e i risultati di tale prova sono stati utilizzati insieme a quelli forniti dai partecipanti per la determinazione dell'esito quantitativo (titolo sierologico).

6 Strutture hanno eseguito le prove in due giornate consecutive (C, D, E, H, I, L) o nella stessa giornata (I), mentre nelle altre 3 Strutture la fine prova rispetto all'inizio prova è stata dilazionata di 2 giorni (G), di 7 giorni (A) e di 20 giorni (B). Non sono pervenute le modalità di conservazione dei campioni.

I partecipanti hanno applicato come antigeni le stesse 8 sierovarianti ricercate presso il CRNL: Bratislava (sierogruppo Australis), Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Copenhageni (sierogruppo Icterohaemorrhagiae), Pomona, Hardjo (sierogruppo Sejroe) e Tarassovi, con alcune eccezioni ed aggiunte indicate in Tabella 2.

In Tabella 2 sono indicati tutti i sierogruppi individuati con il relativo titolo sierologico.

Nei casi in cui sono state applicate due sierovarianti dello stesso sierogruppo (Copenhageni e Icterohaemorrhagiae del sierogruppo Icterohaemorrhagiae; Hardjo e



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

Saxkoebing del sierogruppo Sejroe), sono stati ottenuti titoli positivi verso tutte le sierovarianti del sierogruppo verso il quale il campione era positivo.

Nel campione 5 è stato individuato da tutti i partecipanti il sierogruppo Icterohaemorrhagiae come sierogruppo a più alto titolo, secondo atteso (v. Tabella 1). Nello stesso campione sono stati rilevati anche altri sierogruppi a titoli minori: Australis identificato da tre laboratori (A, B, L) e Pomona da due laboratori (B, D). Il fatto che si sia trattato di positività a basso titolo, in presenza di positività multipla, ne giustifica il rilievo non uniforme da parte delle diverse strutture. Queste positività non sono state comprese nell'analisi statistica.

Tabella 2: Risultati delle prove eseguite in due repliche.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L
1	S 400-800	S 100-100	S 200-200	S 800-800	Sha 100-100 Ssax 100-100	/	Neg-Neg	S 200-200	S 400-400	S 400-400
2	A 800-800	A 800-1600	A 200-200	A 400-400	A 100-100	/	NT	A 800-800	A 800-800	A 400-400
3	Neg-Neg	Neg-Neg	Neg-Neg	Neg-Neg	Neg-Neg	/	Neg-Neg	Neg-Neg	Neg-Neg	Neg-Neg
4	P 3200-6400	P 800-800	P 800-800	P 6400-6400	P 100-200	/	P 6400-6400 S 6400-6400	P 1600-1600	P 800-800	P 800-800
5	I 400-200 A 100-100	I 400-400 A 200-400 P100-100	Ii 200-200 Ic 200-200	Ii 800-800 Ic 400-400 P 100-100	Ii 100-100 Ic 100-200	/	I 1600-1600	I 400-400	Ii 400-400 Ic 200-200	I 200-200 A 100-100

A: sierogruppo Australis, I sierogruppo Icterohaemorrhagiae (sierovariante Copenhageni), P sierogruppo Pomona, S sierogruppo Sejroe (sierovariante Hardjo)

Ic: sierogruppo Icterohaemorrhagiae, sierovariante Copenhageni

Ii: sierogruppo Icterohaemorrhagiae, sierovariante Icterohaemorrhagiae

Sha: sierogruppo Sejroe, sierovariante Hardjo

Ssax: sierogruppo Sejroe, sierovariante Saxkoebing

NT: non testato

Il laboratorio A non ha testato il sierogruppo Canicola, il laboratorio G non ha testato il sierogruppo Australis, il laboratorio H non ha testato il sierogruppo Grippotyphosa, i laboratori D e I non hanno testato il sierogruppo Ballum.



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

ANALISI STATISTICA E VALUTAZIONE DEI RISULTATI

ESITO QUALITATIVO – DIAGNOSI DI SIEROGRUPPO

Parametri di accettabilità dei risultati

Vengono considerati non accettabili in termini qualitativi i risultati che indicano identificazione errata di sierogruppo. In caso di positività multiple è stato preso in considerazione il sierogruppo con titolo più elevato.

Correttezza dell'esito

I risultati di ciascun laboratorio sono stati classificati come corretti o errati rispetto al materiale di riferimento in base al sierogruppo individuato (v. Tabella 3).

Tabella 3 – Risultati della diagnosi di sierogruppo

campione	sierogruppo	corretti	errati	%	CI95%
1	Sejroe	7	1	87,5	47,35-99,68
2	Australis	7	0	100	59,04-100
3	campione negativo	8	0	100	63,06-100
4	Pomona	8	0	100	63,06-100
5	Icterohaemorrhagiae	8	0	100	63,06-100

Per il campione 2 è stata valutata la performance di 7 laboratori in quanto il laboratorio G non ha eseguito l'esame.

Un laboratorio (G) non ha rilevato il titolo per Sejroe nel campione 1 (falso-negativo) e nel contempo ha identificato erroneamente nel campione 4 positività ad alto titolo per il sierogruppo Sejroe. Questi due esiti potrebbero essere ricondotti alla mancata identità del ceppo sierovariante Hardjo utilizzato nella prova come antigene rappresentativo del sierogruppo Sejroe.

Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità e la riproducibilità del dato qualitativo sono state espresse rispettivamente mediante indici di accordanza e concordanza.

Il valore di accordanza degli esiti intra-laboratorio è risultato pari a 1, il valore di concordanza degli esiti tra laboratori pari a 0,95 (IC95%: 0,81-1). Ciò riflette un grado di accordo quasi perfetto dei risultati espressi su repliche da uno stesso laboratorio ed un accordo elevato dei risultati tra laboratori.



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

ESITO QUANTITATIVO –TITOLO SIEROLOGICO

Premessa

Nelle diverse strutture vengono utilizzati metodi che, pur nel rispetto delle linee guida OIE, non sono completamente armonizzati.

Il test, che fa uso di antigeni vivi, è di per sé caratterizzato da ampia variabilità, pertanto l'analisi statistica del dato quantitativo ha scopo esplorativo ai fini di evidenziare risultati anomali degni di ulteriore approfondimento, non necessariamente errati.

Per ogni campione è stata calcolata la distribuzione percentile dei risultati e il valore modale. La presenza di outliers è stata indagata sia mediante box and whiskers plot sia mediante calcolo di valori normalizzati.

Identificazione dei valori anomali

Di seguito sono riportate la distribuzione percentile dei risultati e il valore modale.

Tabella 4 - Distribuzione percentile del titolo

campione	sierogruppo	min	max	mediana	Range inter- quartile	moda
1	Sejroe*	100	800	300	175-400	400
2	Australis	100	1600	600	350-800	800
4	Pomona	100	6400	800	800-5600	800
5	Icterohaemorrhagiae	100	1600	300	200-400	200

* esclusi gli esiti di negatività

Prima di procedere all'elaborazione statistica, i dati hanno subito una trasformazione logaritmica in base 2. Nel grafico a scatola che segue è riportata la distribuzione del titolo per ciascun campione con la relativa identificazione di sierogruppo. La barra in nero grassetta indica il valore della mediana, gli estremi della scatola definiscono il range inter-quartile, i baffi definiscono un range pari a 1.5 volte il range inter-quartile.

La linea non grassetta indica il valore della media. Il punto pone in evidenza un valore anomalo collocato al di fuori del range delimitato dai baffi.

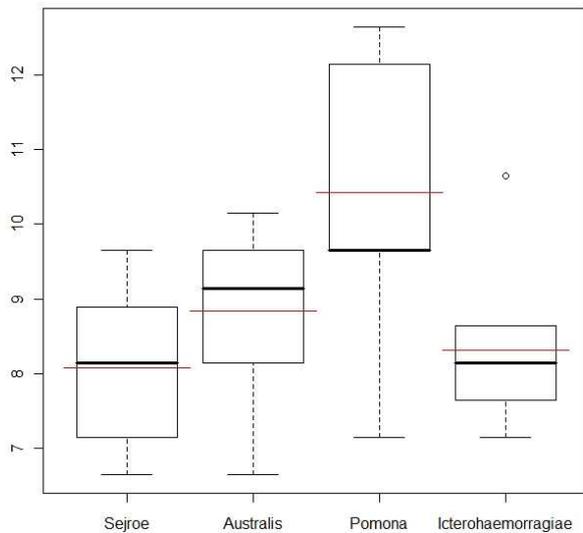


**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**



<i>campione</i>	<i>media log2</i>	<i>ds log2</i>
1	8.08	1.12
2	8.83	1.19
4	10.42	1.80
5	8.31	1.03

Il valore risultato come outlier tramite ispezione grafica è il titolo pari a 1/1600 per il campione 5, sierogruppo Icterohaemorrhagiae, espresso dal laboratorio G.

Per ciascun esito è stato calcolato il corrispettivo z-score previa trasformazione logaritmica in base 2. Di seguito sono riportati per ciascun campione le distribuzioni degli z-score per i diversi laboratori.



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

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

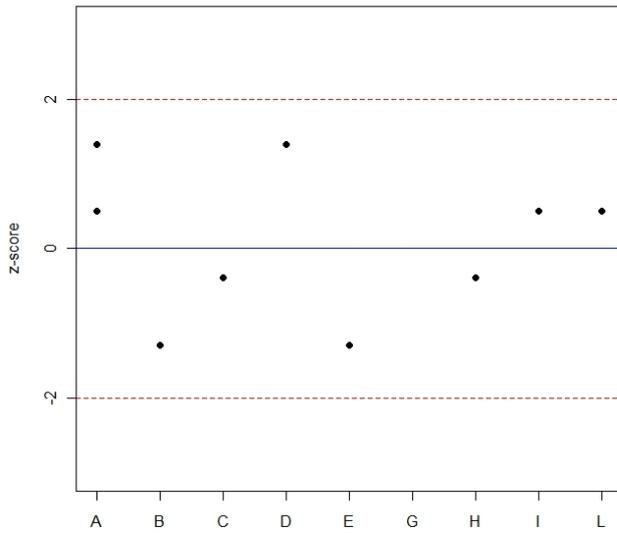


Figura 1 campione 1

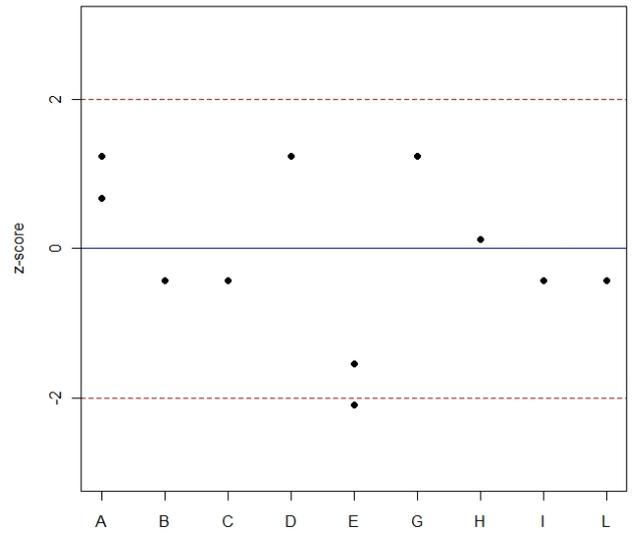


Figura 3 campione 4

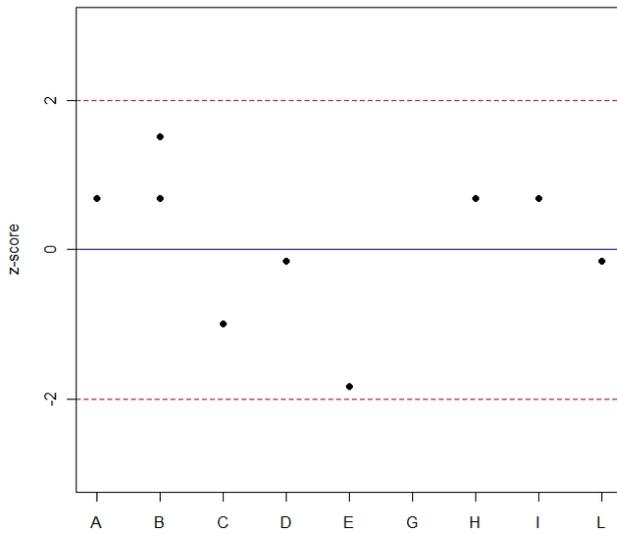


Figura 2 campione 2

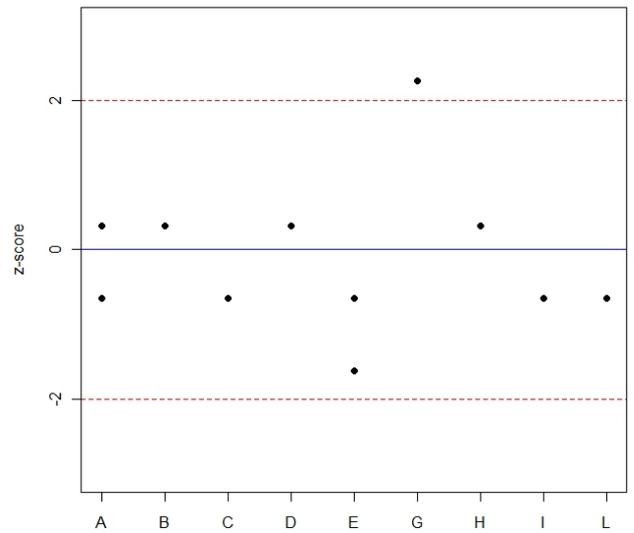


Figura 4 campione 5



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

Nei grafici che precedono si evidenzia la presenza di due casi, uno per il laboratorio E nel campione 4 (Pomona) e uno per il laboratorio G nel campione 5 (Icterohaemorrhagiae) che cadono nella fascia di allerta. Per quanto attiene al primo caso esso riguarda una sola delle due repliche effettuate e il valore cade a ridosso del limite. Riguardo al secondo, si tratta dello stesso esito evidenziato come outlier mediante esplorazione grafica.

L'analisi della varianza non parametrica a una via effettuata mediante test di Kruskal-Wallis ha evidenziato la presenza di differenze nel titolo tra i laboratori ($\chi^2 = 31.49$, gdl = 8, p-value <0.001).

DISCUSSIONE

Dall'osservazione dei dati rappresentati nei grafici a scatola dei campioni positivi, i diversi periodi di tempo intercorsi tra le due repliche previste dal protocollo operativo (v. paragrafo Risultati) non hanno influito sull'esito.

Esistono differenze nella conduzione della prova da parte dei diversi laboratori che vanno indagate.

DIAGNOSI DI SIEROGRUPPO

Rispetto alla rosa di 8 antigeni utilizzati dal laboratorio organizzatore (A Bratislava, B Ballum, C Canicola, G Grippotyposa, I Copenhageni, P Pomona, S Hardjo, T Tarassovi), un laboratorio non ha testato il sierogruppo Australis, uno il sierogruppo Canicola, uno il sierogruppo Grippotyphosa e due il sierogruppo Ballum. Tra queste indisponibilità di reagenti diagnostici, agli effetti del ring test, la sola mancanza di antigene Australis in un laboratorio ha impedito di addivenire al risultato positivo per il siero 2.

Alcuni Istituti hanno incluso nel pannello ulteriori sierovarianti nell'ambito dei sierogruppi testati (Icterohaemorrhagiae del sierogruppo Icterohaemorrhagiae e Saxkoebing del sierogruppo Sejroe), che hanno confermato il sierogruppo (Tabella 2).

La MAT è di solito positiva quando realizzata con diverse sierovarianti nell'ambito dello stesso sierogruppo; tuttavia in certe circostanze l'esito MAT può essere negativo per una sierovariante eterologa nell'ambito dello stesso sierogruppo.

Risultati errati potrebbero derivare da contaminazione batterica, contaminazione crociata di ceppi di *Leptospira*, inserimento di ceppi di errata identificazione nel pannello e deterioramento delle colture utilizzate come antigeni.

Si consiglia ai partecipanti di rivedere le procedure di laboratorio e antigeni utilizzati se:

- non hanno identificato correttamente tutti e quattro i sierogruppi presenti nei campioni 1-2-4-5 (v. Tabella 1);
- hanno riportato risultati classificati come falsi negativi;



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

- hanno riportato titoli > 200 per campioni positivi con sierogruppi eterologhi. Titoli eterologhi bassi (≤ 200) probabilmente rappresentano reazioni crociate, mentre titoli eterologhi più alti potrebbero risultare da contaminazione degli antigeni.

Può essere chiesto un supporto al CRNL per il controllo dell'identità dei ceppi o la fornitura di ceppi da sostituire a quelli problematici.

LIVELLO DEI TITOLI POSITIVI

I vari Round del Proficiency testing internazionale segnalano un'ampia variazione nei titoli positivi riportati per lo stesso campione esaminato con la stessa sierovariante.

L'utilizzo di ceppi vivi come antigeni MAT e la difficoltà nel determinarne la concentrazione rendono ragione della variabilità insita nel metodo. Tale variabilità va limitata il più possibile tenendo sotto controllo le prove.

La necessità di subcoltivare i ceppi impiegati come antigeni MAT frequentemente (età ottimale delle colture: 4-8 gg) comporta la possibilità di modifiche nella resa e nell'agglutinabilità. Ripetuti passaggi in terreno liquido possono determinare una perdita di antigenicità. In questo caso una nuova coltura liquida dovrebbe essere realizzata dalla coltura stock in azoto liquido.

La concentrazione degli antigeni non può essere esatta trattandosi di "antigeni" vivi. Va quindi controllata da operatori esperti direttamente al microscopio in campo oscuro in camera di conta o con l'ausilio di spettrofotometro, a seguito di correlazione tra letture indirette e conte batteriche, secondo le linee guida OIE.

I ceppi impiegati presso i laboratori partecipanti coincidono generalmente con quelli utilizzati presso il CRNL. Tali ceppi sono stati da questo forniti a tutti gli Istituti in occasione del ring test conoscitivo del 2001 e successivamente su richiesta.

Differenze nella conduzione della prova da parte dei diversi laboratori e nei ceppi impiegati come antigeni possono aver inciso sulla variabilità inter-laboratorio indicata in Tabella 5.

Si invita i partecipanti a comparare i propri risultati con i titoli ottenuti negli altri laboratori.

Gli organizzatori del proficiency testing internazionale considerano impossibile designare un "risultato (quantitativo) corretto" per un campione esaminato mediante MAT e ritengono che risultati "insolitamente bassi o alti" per comparazione con la mediana (al di fuori di una diluizione in base due sopra o sotto la mediana stessa) non implicino necessariamente una procedura scorretta o un ceppo non idoneo. In tali casi tuttavia raccomandano il supporto di un centro di referenza internazionale.

Si consiglia di prendere analoghe misure nel caso dei due esiti risultanti nella fascia di allerta dell'analisi statistica condotta nel presente ring test. Il rilievo di titoli insolitamente bassi fa temere esiti falsamente negativi, se si accompagna alla scelta di una soglia diagnostica a titolo elevato.

Il CRNL, se interpellato, si farà carico del problema specifico, anche appoggiandosi al KIT di Amsterdam, scelto come fornitore di materiali diagnostici di riferimento.



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"**

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

**Reparto Batteriologia
CRNL**

CEPPI IN USO E TITOLO SOGLIA PRESSO I LABORATORI PARTECIPANTI

8 Istituti hanno risposto al questionario incluso nella scheda di registrazione dei risultati e due hanno inviato i propri metodi di prova.

A titolo conoscitivo, al fine di migliorare l'uniformità del metodo, si elencano le scelte dei vari Istituti in merito alle sierovarianti ricercate nelle diverse specie animali e alla soglia considerata diagnostica.

Alcune strutture eseguono la prova ricercando tutti i sierogruppi indipendentemente dalla specie animale per ragioni di organizzazione di laboratorio. Altre ricercano sierogruppi particolari a seconda della specie.

Tre strutture non ricercano la sierovariante Ballum o ne limitano la ricerca ad alcune specie. Tale sierovariante, diffusa nei selvatici, risulta di importanza minore.

Quattro strutture (C, D, E, I) affiancano alla sierovariante Copenhageni del sierogruppo Icterohaemorrhagiae, la sierovariante Icterohaemorrhagiae per aumentare la sensibilità della prova. Al fine di definire la sierovariante maggiormente rappresentativa del sierogruppo Icterohaemorrhagiae, sarebbe utile ricevere dalle strutture che operano in routine con entrambe le sierovarianti i dati comparativi raccolti negli ultimi 5 anni.

8 strutture utilizzano nella routine il titolo soglia di 100 e tre di queste, solo in casi particolari, il titolo di 25. Un laboratorio considera come significativi titoli a partire da 400 e, limitatamente ai carnivori, da 1600.

La soglia ≥ 100 consente di evitare rispetto a soglie superiori risultati falsamente negativi e rispetto a soglie inferiori fenomeni di prozona e difficoltà di lettura. In casi mirati si può abbassare la soglia a ≥ 25 affiancandola alla soglia indicata dal test di 100. Il significato diagnostico di un titolo positivo può variare con la sierovariante infettante, con la specie ospite infettata, con la storia vaccinale e con la prevalenza locale della leptospirosi. Non potendo ricorrere a doppio campione (siero acuto e convalescente) e al rilievo di un aumento di 4 volte nel titolo anticorpale, la diagnosi presuntiva di infezione acuta si può basare sull'evidenziazione di titoli molto alti in un animale con quadro clinico di leptospirosi. Al contrario, in caso di infezione cronica, un titolo minimo significativo di 100 o meno può favorire la sensibilità del test.

CONCLUSIONI

Il ring test, nonostante l'esiguità dei campioni, ha dato nel complesso riscontri favorevoli in relazione alla diagnosi di sierogruppo, che è il nucleo dell'attività, con esiti generalmente corretti e concordi.

Ha fornito inoltre elementi utili ai fini del miglioramento della qualità della prova.