



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

Via Bianchi 9 - 25124 Brescia

CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE MALATTIE VESCICOLARI (CERVES)

Tel. 030-2290310 Fax 030-2290369

e-mail: emiliana.brocchi@bs.izs.it; santina.grazioli@bs.izs.it



OIE REFERENCE LABORATORY FOR SWINE VESICULAR DISEASE

**ESERCIZIO DI TRASFERIMENTO DI METODICHE DIAGNOSTICHE PER
AFTA EPIZOOTICA A LABORATORI IZZSS**

AMBITO: PIANO DI EMERGENZA DIAGNOSTICA PER AFTA

PROVE OGGETTO DELL'ESERCIZIO

**PROVE SIEROLOGICHE PER LA RICERCA DI ANTICORPI VERSO
VIRUS AFTOSI:**

- *ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi tipo specifici verso virus aftosi*
- *ELISA trapping 3ABC per la ricerca di anticorpi marker di infezione aftosa*

Laboratori partecipanti:

- N° 11 Istituti Zooprofilattici Sperimentali
- N° 2 Sezioni diagnostiche dell'IZSLER

IZS	Referente
IZS LER, BRESCIA, CERVES	E. Brocchi S. Grazioli
SEZ. IZSLER MANTOVA	C. Rosignoli
SEZ. IZSLER REGGIO EMILIA	M. Dottori
IZS VE, LEGNARO, PD	S. Nardelli
IZS LT, ROMA	M. T. Scicluna
IZS UM, PERUGIA	S. Costarelli/ De Mia
IZS AM, TERAMO	M. Tittarelli
IZS PB, FOGGIA	N. Cavaliere
IZS ME, PORTICI, NA	Di Sarno
IZS CATANZARO	F. Casalnuovo
IZS SI, PALERMO	G. Purpari
IZS SA, SASSARI	A. Oggiano
IZS PLV, TORINO	M.S. Gennero/L. Masoero

INTRODUZIONE

La conferma diagnostica diretta di focolaio di Afta è ottenuta attraverso la dimostrazione di virus aftosi con test virologici, quali isolamento virale, dimostrazione di antigeni o di parti del genoma virale. Tuttavia virus e prodotti virali sono accessibili nell'organismo solo per brevi periodi; la condizione carrier esiste nei ruminanti, ma i test diagnostici per l'evidenziazione del virus nei carrier sono poco sensibili. Al contrario gli anticorpi persistono per mesi o anche anni.

Inoltre, la sierologia può fornire risposte a diverse quesiti epidemiologici; pertanto, **il controllo dell'afta dipende largamente dalle analisi anticorpali e da programmi di siero sorveglianza.**

Nell'Afta, le principali applicazioni della sierologia riguardano:

- Controlli durante focolai/epidemie (in associazione con altri test diagnostici)
- Piani di siero sorveglianza dopo focolai/epidemie per il riconoscimento della stato FMD-free
- Valutazione della copertura vaccinale (controllo di campagne di vaccinazione)
- Monitoraggio della circolazione virale in paesi che praticano la profilassi vaccinale
- Monitoraggio di una situazione epidemiologica sconosciuta (infezione pregressa, in atto, stato indenne, ecc)
- Monitoraggio sierologico in Paesi esposti al rischio di introduzione (es: zone tampone)
- Import/export, movimentazioni/commercio di animali (incluse specie esotiche, animali da circo, zoo, ecc)
- Valutazione della potenza vaccinale (in sostituzione del challenge)

Dagli anni cinquanta i metodi sierologici hanno subito un costante miglioramento: la ricerca di anticorpi verso le proteine capsidiche virali, per lo più sierotipo-specifici, è realizzabile con test ELISA ed antigeni virali sottoposti ad inattivazione, mentre la Sieroneutralizzazione, complessa e facente uso di virus vivo, è utilizzata per particolari applicazioni/studi e come test di conferma. Il principale progresso nella sierologia è stato lo sviluppo di test in grado di differenziare tra animali infetti e vaccinati.

Nell'Afta la differenziazione è basata sulla identificazione di anticorpi verso le proteine non strutturali (NSP) del virus. Le numerose NSP, così come le proteine strutturali, capsidiche (SP), sono prodotte durante il ciclo di replicazione virale; perciò, animali infetti producono anticorpi sia verso le SP che verso le NSP. I vaccini aftosi di nuova generazione consistono di particelle virali inattivate e parzialmente purificate: il processo di purificazione elimina le NSP prodotte durante la replicazione, perciò animali vaccinati con vaccini purificati svilupperanno anticorpi solamente verso le proteine capsidiche, mentre animali infetti producono anticorpi verso entrambe SP e NSP.

Tra le svariate NSP, la poliproteina 3ABC è indicata come la più immunogena; una caratteristica peculiare della 3ABC e delle NSP in generale è che esse sono comuni tra i sette sierotipi aftosi.

Pertanto la dimostrazione di anticorpi anti-3ABC è indicativa di una infezione pregressa o in atto con qualunque dei sette sierotipi, permettendo la rilevazione di animali infetti indipendentemente dall'eventuale interferenza vaccinale. I test sierologici per la dimostrazione di anticorpi anti-NSP sono metodi ELISA eseguiti con antigeni ricombinanti e completamente "safe".

Su questa base delle nuove potenzialità diagnostiche, la nuova direttiva europea per l'Afta (2003/85/EC) ha reintrodotto la vaccinazione d'emergenza, associata alla distinzione sierologica tra infetti e vaccinati, come strategia di controllo in caso di focolai.

Il ring test del presente studio è stato organizzato come integrazione del *Laboratory Contingency Plan* del CERVES, al fine di mantenere la capacità e verificare la performance dei laboratori italiani chiamati a coadiuvare il CERVES nell'eventualità di un'epidemia aftosa. Le prove sierologiche oggetto del ring test corrispondono ai metodi trasferibili ad altri laboratori, poiché basati sull'utilizzo di virus inattivati e di antigeni ricombinanti; in particolare esse consistono in:

- un test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi verso proteine virali strutturali, tipo-specifiche; è stato scelto come modello il test per gli anticorpi anti FMDV, tipo Asia 1;
- un test ELISA indiretta per la ricerca di anticorpi anti-3ABC, marker di infezione con qualunque sierotipo aftoso.

I suddetti metodi che sfruttano le potenzialità e caratteristiche degli anticorpi monoclonali, sono stati sviluppati dal CERVES e soggetti a processo di validazione riconosciuto a livello internazionale; il CERVES mantiene anche le capacità di produzione dei kit.

MATERIALI E METODI

Metodi di Prova

1. Test ELISA competizione per la ricerca di anticorpi tipo specifici verso virus aftosi; modello scelto: anticorpi anti-Asia 1 (Metodo di Prova Normato: OIE 'Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Ed-2008 cap 2.1.5, par B 2b)
2. Test ELISA trapping per la ricerca di anticorpi 3ABC marker di infezione aftosa (Metodo di Prova Normato: OIE 'Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Ed-2008 cap 2.1.5, par B 2d).

I reagenti di entrambe le reazioni sono stati prodotti e distribuiti dal CERVES, con l'ausilio del Reparto Biotecnologie dell'IZSLER.

Ai laboratori è stato chiesto di eseguire tre prove indipendenti (ad esempio eseguite da tre diversi operatori, o dallo stesso operatore in tre giorni diversi).

Composizione del pannello di sieri

Ad ogni laboratorio partecipante sono stati distribuiti 27 campioni di siero codificati con numero progressivo da 1 a 27. Per la costituzione del pannello sono stati utilizzati i sieri di 12 bovini, di seguito descritti:

- Siero A: siero di bovino infetto, originato dal focolaio di afta FMDV-A Albania 1996.
- Siero B: Siero sperimentale di bovino ("Bianca"), vaccinato con FMDV-Asia1. Prelevato 36 dpv.
- Siero C: Siero sperimentale di bovino ("Pezzata"), vaccinato con FMDV-Asia1. Prelevato 36 dpv.
- Siero D: Siero sperimentale di bovino immunizzato con NSP-3ABC ricombinante espressa in E. coli.
- Sieri (E-N): sieri di otto bovini di campo negativi

Per la costituzione dei 27 campioni del pannello sono stati inseriti:

- diluizioni scalari dei sieri positivi in siero negativo
- campioni costruiti in laboratorio. In particolare, i sieri B e C sono stati miscelati con il siero D al fine di ottenere in modo artificiale il profilo sierologico di animali infetti, superando alla difficoltà di reperimento di sieri di animali infetti in adeguata quantità
- 4 campioni positivi in doppia aliquota (verifica della ripetibilità).

La composizione dei campioni (dettaglio in tabella 1) rispecchia tutte le diverse possibili condizioni immunologiche nei confronti di virus aftosi.

Riservatezza

Il CERVES si impegna a trattare i dati in forma riservata.

I Laboratori sono identificati con un numero.

Tabella 1: Composizione, origine e caratteristiche relative al pannello di sieri distribuiti

		identificativo SIERO	risultati ELISA competitiva FMDV- Asia 1	risultati ELISA trapping 3ABC	Interpretazione
Siero di campo, bovino infetto con FMDV A- Albania, 1996	1/1	1	neg	pos	Infetto (non FMDV-Asia 1)
	1/3	15	neg	pos	Infetto (non FMDV-Asia 1)
Campioni di siero ottenuti artificialmente miscelando siero di bovino vaccinato con FMDV-Asia 1 (Siero B) e siero di bovino immunizzato con 3ABC ricombinante espressa in E.coli (Siero D)	Siero B 1/1 Siero D 1/1	3,17	pos	pos	Infetto (FMDV-Asia 1)
	Siero B 1/3 Siero D 1/10	6	pos	pos	Infetto (FMDV-Asia 1)
	Siero B 1/6 Siero D 1/20	10,12	pos	pos	Infetto (FMDV-Asia 1)
	Siero B 1/9 Siero D 1/30	14	pos	pos	Infetto (FMDV-Asia 1)
	Siero B 1/15 Siero D 1/30	25	pos	pos	Infetto (FMDV-Asia 1)
	Campioni di siero ottenuti artificialmente miscelando siero di bovino vaccinato con FMDV-Asia 1 (Siero C) e siero di bovino immunizzato con 3ABC ricombinante espressa in E.coli (Siero D)	Siero C 1/1 Siero D 1/30	21	pos	pos
Siero C 1/30 Siero D 1/30		18	pos	pos	Infetto (FMDV-Asia 1)
Siero di bovino vaccinato con FMDV-Asia 1 (Siero C)	1/1	7	pos	neg	Vaccinato
Siero di bovino vaccinato con FMDV-Asia 1 (Siero B)	1/5	16,24	pos	neg	Vaccinato
	1/15	11	pos	neg	Vaccinato
Diluizioni di siero di bovino immunizzato con 3ABC ricombinante espressa in E.coli (Siero D)	1/1	19	neg	pos	Infetto (non FMDV-Asia 1)
	1/5	4	neg	pos	Infetto (non FMDV-Asia 1)
	1/30	22,27	neg	pos	Infetto (non FMDV-Asia 1)
sieri negativi di campo (Sieri E → N)	1/1	9	neg	neg	Negativo
	1/1	5	neg	neg	Negativo
	1/1	13	neg	neg	Negativo
	1/1	20	neg	neg	Negativo
	1/1	8	neg	neg	Negativo
	1/1	2	neg	neg	Negativo
	1/1	26	neg	neg	Negativo
	1/1	23	neg	neg	Negativo

NOTA: i risultati riportati in tabella sono stati confermati con tre prove indipendenti, effettuate al CERVES

RISULTATI

Hanno partecipato alla prova inter-laboratorio 10 IZZSS, oltre al Laboratorio diagnostico del CERVES e a due Sezioni Diagnostiche dell'IZSLER, per un totale di 13 Laboratori.

Undici laboratori hanno fornito i risultati delle due prove; un laboratorio ha prodotto i risultati di una sola prova e un laboratorio non ha inviato risultati.

Solid-Phase Competitive ELISA (SPCE) per la determinazione di Anticorpi anti-FMDV Asia 1

Valutazione dei controlli della reazione

I criteri di accettabilità della reazione sono impostati su tre controlli, che devono essere presenti in ogni micropiastre:

- *Controllo Antigene*: consiste di quattro repliche (= pozzetti) della reazione eseguita sostituendo tampone al siero. I rispettivi valori di Densità ottica (DO) rappresentano il controllo di reazione 100% = totale assenza di inibizione, e forniscono il valore di riferimento verso il quale viene calcolata l'inibizione generata dai sieri controllo e in esame.
- *Siero Controllo positivo*: siero a medio titolo, esaminato in quattro diluizioni scalari, da 1/10 in base 3 (1/10, 1/30, 1/90, 1/270), calibrato in modo da produrre una curva dose-risposta con linearità nel range delle quattro diluizioni esaminate.
- *Siero Controllo Negativo*: pool di sieri negativi, esaminato in due diluizioni, 1/10, 1/30.

Espressione dei risultati

Trattandosi di un test competitivo i risultati sono espressi come percentuale di inibizione della reazione di controllo antigene.

La diluizione di screening dei sieri è 1/10; il risultato è

Positivo: quando la % inibizione è ≥ 70

Negativo: quando la % inibizione è < 70

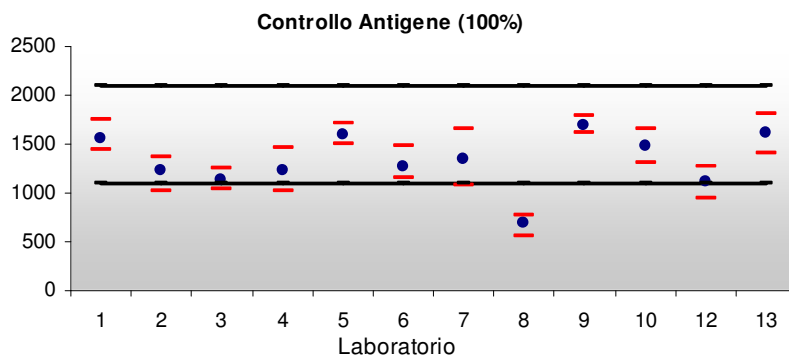
Risultati del Controllo Antigene

In accordo al criterio di accettabilità definito per questo metodo di prova, il valore di DO (media di quattro pozzetti per piastra) della reazione di controllo antigene (assenza di inibizione) deve essere compreso nel range $1,6 \pm 0,5$.

In figura 1 sono riportati i valori ottenuti da 12 su 13 laboratori partecipanti, espressi come valori di DO minimo, massimo e medio di 12 repliche, corrispondenti ai quattro pozzetti della reazione di Controllo Antigene in tre piastre indipendenti.

- 11 su 12 Laboratori hanno ottenuto valori di DO entro i limiti indicati nella procedura (1,1-2,2).
- Un Laboratorio ha ottenuto valori di Densità Ottica inferiori al range di accettabilità.
- L'escursione dei valori intra-laboratorio è limitata, indice di buona ripetibilità.

Figura 1. Valori medio, minimo e massimo del Controllo Antigene (100%), ricavati da 3 reazioni indipendenti (4 repliche/piastra X 3 piastre) per ciascun laboratorio.

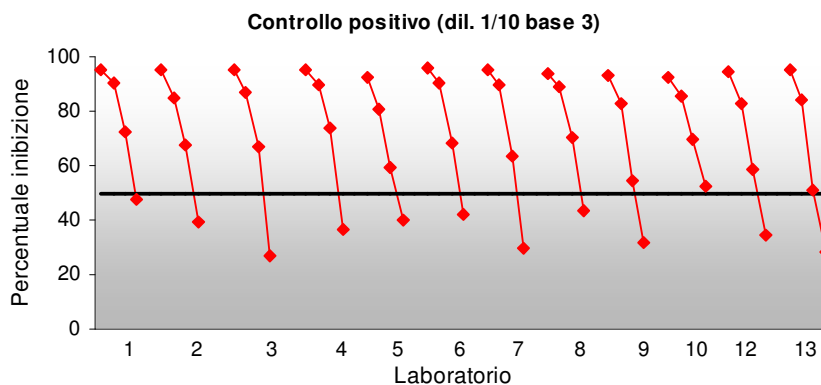


Siero controllo positivo

Il Siero di controllo positivo è calibrato per produrre una curva dose-risposta (percentuali di inibizioni decrescenti) con le quattro diluizioni esaminate. La percentuale di inibizione del 50% è attesa tra le diluizioni 1/90 e 1/270 (corrispondenti alla terza e quarta diluizione).

Le curve dose-risposta osservate nei 13 laboratori sono sovrapponibili e parallele (figura 2). In tutti i laboratori i risultati sono conformi all'atteso.

Figura 2. Curve dose-risposta del Siero di Controllo positivo ottenute dai diversi laboratori (percentuali di inibizione osservate alle quattro diluizioni esaminate, da 1/10 in base 3 (valori medi di tre prove)



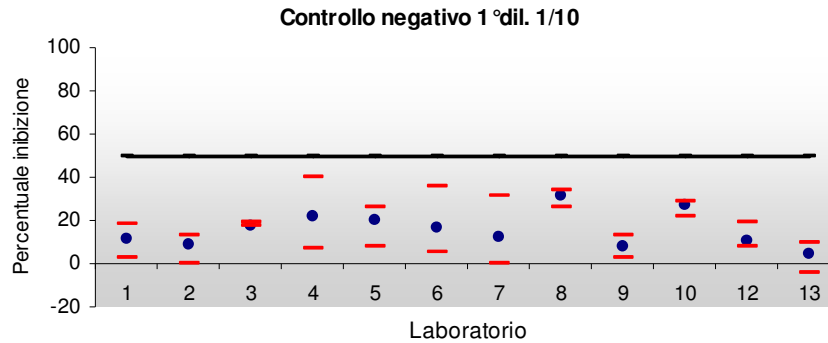
Siero controllo negativo

In figura 6 sono riportati i valori medi, con rispettivi valori minimi e massimi, osservati alla prima diluizione (1/10) del siero di controllo negativo.

L'inibizione media prodotta dal Siero Negativo, così come i valori riscontrati nelle singole repliche, rientrano nel limite indicato dalla procedura ($\leq 50\%$ alla diluizione 1/10) in tutti i laboratori.

Nella maggior parte dei laboratori i valori di inibizione media sono sovrapponibili ed inferiori al 20% (valore superato sono dai laboratorio 8 e 10); l'escursione dei valori tra prove intra-laboratorio è contenuta in otto Laboratori e più elevata in altri quattro Laboratori (n. 4, 5, 6, 7).

Fig. 3. Media, valori minimi e massimi delle percentuali di inibizione del Siero di Controllo negativo (prima dil. 1/10) osservati dai laboratori (derivati da tre prove)



Test ELISA trapping per la ricerca di anticorpi 3ABC marker di infezione aftosa

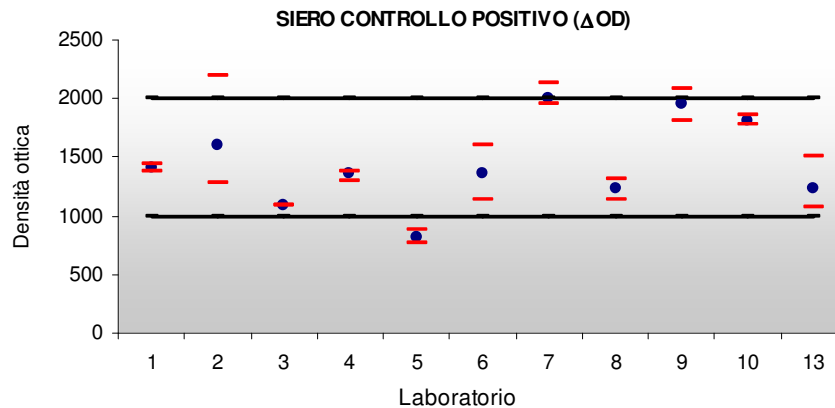
Valutazione dei controlli della reazione

Siero controllo positivo

Il Siero di controllo positivo è il campione di riferimento rispetto al quale vengono espressi i risultati dei sieri in esame. La DO attesa per il controllo positivo, risultante dalla differenza dell'assorbanza del pozzetto in presenza di antigeni e l'assorbanza in assenza di antigeni, deve essere compresa nel range $1,5 \pm 0,5$ (espresso anche nella forma 1500 ± 500).

I valori medi di tre repliche osservati dai diversi Laboratori rientrano nel range ammesso, ad eccezione del laboratorio 5, che ha registrato valori leggermente inferiori al limite minimo in tutte le prove. L'escursione dei valori tra Laboratori è di circa 1 OD e si estende in tutto il range indicato dalla procedura (Figura 4). Diversamente, la variabilità intra-laboratorio è molto più contenuta, con una sola eccezione per il laboratorio 2.

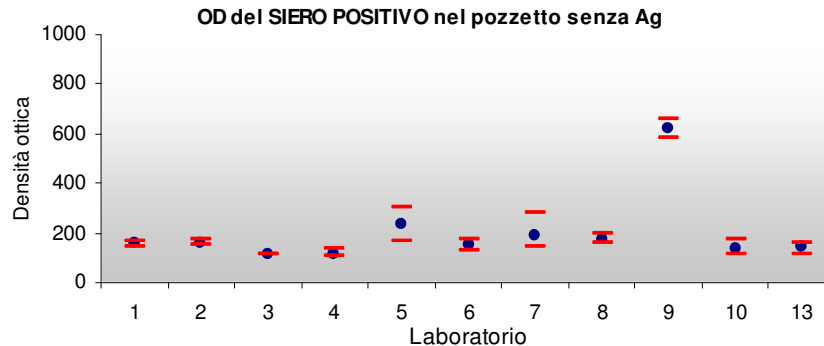
Figura 4. Valori medi, minimi e massimi della DO netta del Siero di Controllo positivo osservati dai laboratori (valori derivati da tre prove)



Lab. 9 : dati derivati da due sole repliche

La reazione prevede per ogni siero in esame, inclusi quelli di controllo, la sottrazione del background generato in pozzetti privi di antigene. La figura 5 mostra il livello del background, espresso in valori di DO medi, minimi e massimi riscontrati nei vari laboratori per il siero di controllo positivo. Ad eccezione del Laboratorio 9, che ha osservato valori elevati e costanti intorno a 0,6 OD (600 nel grafico), in tutti gli altri laboratori il background è contenuto ed omogeneo, con valori $\leq 0,2$ OD.

Figura 5.: Valori medi, minimi e massimi del background osservato per il Siero di Controllo positivo (pozzetti senza antigene)



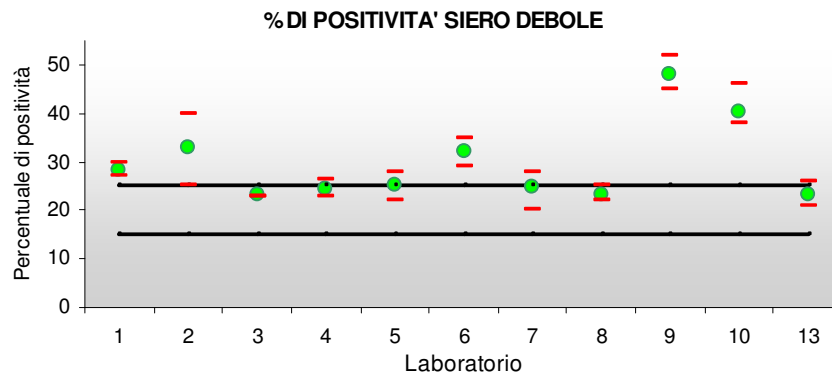
Siero controllo debole positivo

In Figura 6 sono riportati i risultati del siero di controllo debolmente positivo, espressi come percentuali di positività (%P) rispetto al controllo positivo. Il criterio di accettabilità indicato nella procedura prevedeva valori nel range $20\% \pm 5$ per il controllo debole. In sei laboratori i risultati ottenuti sono prossimi al limite superiore, mentre sono maggiori in altri cinque laboratori.

I risultati ottenuti ci suggeriscono di ricalibrare questo controllo o adeguare il range di accettabilità. La variabilità intra-laboratorio osservata nelle tre prove è molto contenuta.

Confermando il trend osservato per il controllo positivo, i valori di DO prodotti dal siero debole nel pozzetto senza antigene (background) sono $\leq 0,2$ unità, tranne per il Laboratorio 9 che ha registrato un valore medio di 0,39 unità di DO (dati non mostrati).

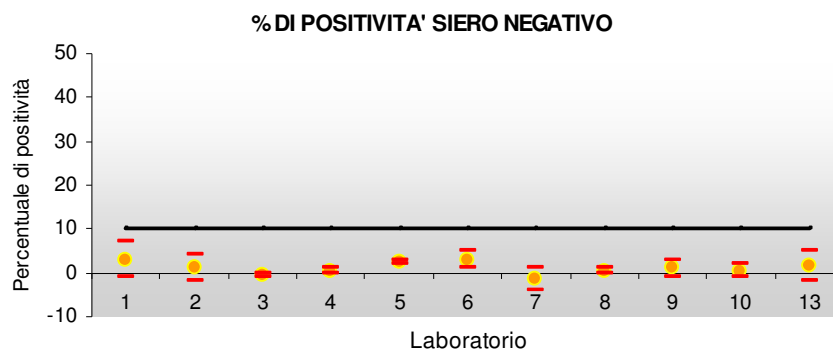
Fig. 6. Risultati del Siero di Controllo debolmente positivo osservati dai laboratori (percentuale di positività, valori medi, minimi e massimi derivati da tre prove)



Siero di controllo negativo

In Figura 7 sono riportati i valori medi di tre prove della %P osservata per il siero di controllo negativo. Tutti i Laboratori hanno ottenuto valori conformi all'atteso (%P <10).

Fig. 7. Risultati del Siero di Controllo negativo osservati dai laboratori (percentuale di positività, valori medi, minimi e massimi derivati da tre prove)



Valutazione dei risultati forniti dai Laboratori sui sieri in esame.

Ai laboratori era richiesto di:

- esaminare ciascuno dei 27 campioni ciechi con le due prove sierologiche, ripetendo le prove tre volte;
- esprimere il risultato in termini di positivo/negativo in ciascuna prova e come esito delle tre prove complessivamente;
- dare infine una interpretazione sullo stato aftoso dell'animale in termini di Infetto/Vaccinato/Negativo sulla base del risultato comparativo nelle due prove sierologiche. Infatti, la positività al test ELISA competitiva per anticorpi anti-FMDV Asia 1 (proteine capsidiche) indica vaccinazione o infezione, mentre la positività al test ELISA trapping per anticorpi anti-FMDV 3ABC (proteine non-strutturali) è indice di infezione.

Nelle tabelle successive sono dettagliati i risultati attesi e quelli espressi dai laboratori per le due prove in ciascuna delle tre repliche. Per una più facile lettura i sieri in esame sono stati riordinati in modo da rispecchiare la tipologia di reattività e la scalarità delle diluizioni.

Solid-Phase Competitive ELISA (SPCE) per Anticorpi anti-FMDV Asia 1

Le tabelle riportano il risultato osservato alla diluizione iniziale di screening 1/10 e l'interpretazione data dal Laboratorio tenendo conto dell'insieme dei dati.

Cinque Laboratori (1, 4, 6, 7, 13) hanno ottenuto risultati corretti in tutte le prove. Da segnalare solo un risultato falso-negativo nel Lab. 6 (siero n. 11) ed uno nel lab. 7 (siero n.1) entrambi borderline in una di tre prove, senza interferenza nell'interpretazione finale.

Il Laboratorio 2 ha avuto una ridotta performance nella terza prova, dove sono stati ottenuti due risultati falsi-positivi ed uno falso-negativo (tutti con valori border), che però non hanno influito sull'interpretazione finale del campione, data correttamente.

I Laboratori 3 e 8 hanno riportato in tutte le tre prove risultati falsi-positivi per i sieri n. 1 e 13. Questa osservazione è comune ad altri due Laboratori (Lab 5, 10), indicando una probabile iperreattività non-specifica per questi due campioni.

Il Laboratorio 5, oltre ai due campioni 1 e 13, ha ottenuto un terzo siero (n. 26) sistematicamente falso-positivo nelle prove ripetute.

Il Laboratorio 9 non ha identificato come positivo il campione n. 11, che rappresentava la diluizione end-point di un siero positivo (n. 11); inoltre è stato osservato un risultato border positivo in una prova per un campione negativo (n. 4), che non è stato tuttavia considerato nell'interpretazione.

Il laboratorio 10, oltre ai due campioni 1 e 13, ha ottenuto un terzo siero (n. 5) sistematicamente falso-positivo nelle prove ripetute; inoltre, due risultati falsi-negativi sono stati attribuiti nella terza

prova in campioni vicini alla soglia (n. 25) o positivi (n. 16), ed un falso-positivo in una prova del campione n. 26.

Il laboratorio 12 ha riportato due risultati falsi-positivi, seppur borderline, in una delle tre prove per i sieri n. 1 e 9.

ELISA trapping per anticorpi 3ABC, marker di infezione aftosa

Sette (3, 4, 6, 7, 9, 10, 13, corrispondenti al 64%) su undici Laboratori hanno prodotto i risultati per questo test ottenendo risultati corretti in tutte le prove.

Il laboratorio 1 ha presentato una certa imprecisione, con una replica errata su tre prove, distribuita casualmente in cinque campioni, oltre ad un siero sistematicamente falso-positivo nelle tre prove.

Il Laboratorio 2 ha confermato una ridotta performance nella terza prova, che ha generato una replica errata su tre prove in quattro campioni, risultati falsi-positivi; i sieri falsi-positivi nelle due prove non coincidono, indicando una casualità nell'errore. Tuttavia, come per il test precedente, i singoli risultati scorretti non hanno influito sull'interpretazione finale dei campioni, resa correttamente.

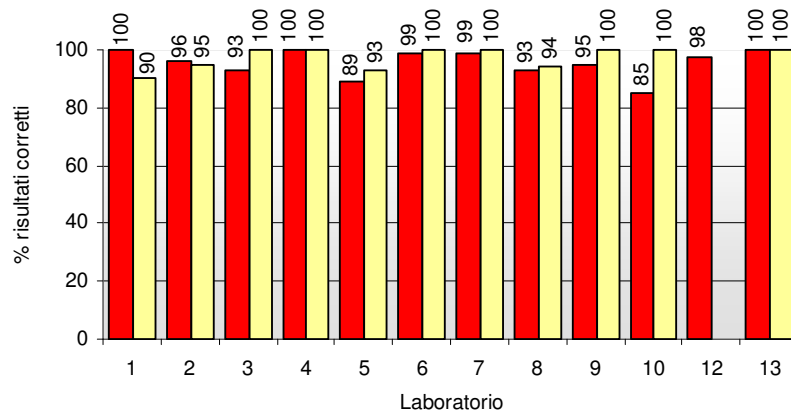
Il laboratorio 5 ha ottenuto due sieri (n. 7 e 2) sistematicamente falsi-positivi nelle tre prove ripetute.

Il laboratorio 8 ha eseguito due prove, classificando erroneamente come falso-negativo il siero n. 15 in entrambe le prove ed il siero n. 27, seppur molto vicino alla soglia di positività, in una delle due prove.

Commenti e conclusioni

La figura 8 indica la capacità globale di ciascun laboratorio (espressa in percentuale) di classificare correttamente i sieri (risultato dicotomico positivo/negativo) rispetto al risultato atteso. L'analisi è stata condotta su 27 campioni esaminati tre volte, per un totale di 81 determinazioni per laboratorio per ciascuna delle due prove ELISA.

Fig. 8: Percentuale di risultati corretti espressi dai laboratori.



Legenda: Istogrammi rossi → ELISA competitiva per Ac anti-FMDV Asia 1
Istogrammi gialli → ELISA 3ABC per Ac marker di infezione

I risultati sono nel complesso soddisfacenti: una buona percentuale di Laboratori ha ottenuto risultati corretti per tutti i campioni in entrambe le prove; la percentuale di errore è contenuta ed in genere causata da risultati borderline. E' inoltre da segnalare che spesso l'errore si è verificato nell'esame di due campioni (n. 1 e 13) che hanno prodotto risultati falsi-positivi in vari Laboratori, indicando una iper-reattività di questi sieri; mentre per il campione di campo negativo n. 11 si tratta

di una probabile aspecificità, per il campione n. 1 la tendenza a reagire nel test per Ac anti-FMDV Asia 1 è probabilmente dovuta ad una parziale cross-reazione degli anticorpi indotti dall'infezione con afta tipo A nell'animale donatore del siero.

La elevata percentuale di risultati corretti è significativa anche in considerazione che le due metodiche non sono in uso corrente presso i Laboratori partecipanti, ma sono state eseguite per la prima volta (ad eccezione del Laboratorio presso il CERVES). In aggiunta, non si trattava di kit pronto-uso, ma di test in-house notoriamente meno robusti dei kit stabilizzati, dei quali sono stati forniti i reagenti immunologici essenziali ed il protocollo: le sorgenti di possibile variabilità tra Laboratori in queste condizioni sono molteplici, tuttavia i risultati hanno dimostrato un buon grado di robustezza, evidenziato anche dalla lettura quantitativa del dato (non valutata in questa elaborazione, ma riportata nelle tabelle riferite ai singoli Laboratori).

Nel pannello di 27 sieri, quattro campioni erano presenti ciascuno in due aliquote identiche, mentre alcuni campioni rappresentavano diluizioni scalari di un siero.

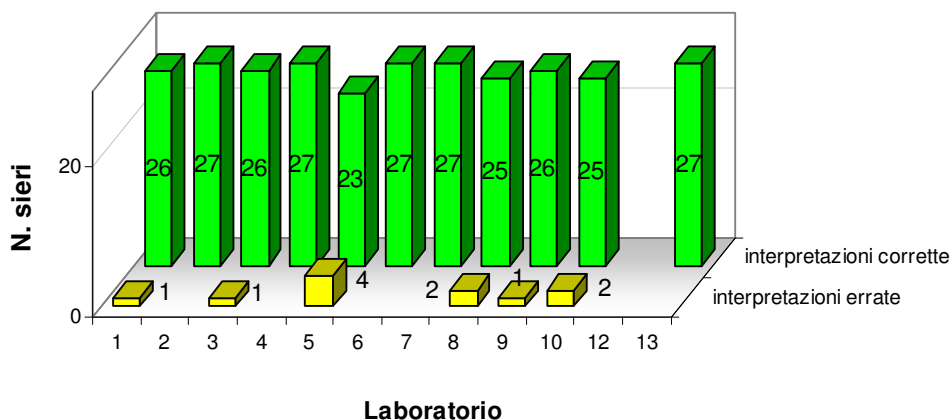
I risultati sui campioni replicati sono stati conformi e, nel test 3ABC-trapping ELISA dove l'espressione del risultato è semi-quantitativa, anche il valore fornito è stato coerente con i risultati attesi, indicando una buona ripetibilità.

Similmente, i valori ottenuti per i campioni diluiti sequenzialmente rispecchiano l'andamento della concentrazione anticorpale nel campione.

In genere, i Laboratori con le migliori performance complessive sono anche quelli con il miglior risultato in termini di ripetibilità e coerenza nei risultati quantitativi.

Gli anticorpi anti-NSP sono marker di infezione, pertanto l'analisi comparativa dei risultati delle due metodiche ELISA permette di definire lo stato immune dell'animale, discriminando tra vaccinazione (con virus tipo Asia 1) ed infezione (con virus tipo Asia 1 o diverso). L'interpretazione attribuita a ciascun campione è stata in tutti i Laboratori corretta sulla base dei risultati ottenuti, ma ha comportato la definizione di uno stato immune erroneo nel caso di campioni che hanno ripetutamente prodotto risultati falsi-positivi o falsi-negativi in una delle due metodiche (figura 9).

Fig. 9. Interpretazione dello stato immune dei campioni (negativo/vaccinato/infetto) sulla base del risultato comparativo delle due metodiche.



Laboratorio N.1

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1						ELISA trapping 3ABC						Esito	Interpret	
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		Esito	Prova 1		Prova 2		Prova 3			
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% pos	results	% pos		results	% pos	results	Esito				
A 1/1	1	Neg	Pos	I	51	N	50	N	53	N	N	65,0	P	63,1	P	61,5	P	P	I	
A 1/3	15	Neg	Pos	I	41	N	41	N	45	N	N	23,2	P	17,0	P	0,3	N	P	I	
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	95	P	93	P	93	P	P	131,6	P	124,6	P	138,3	P	P	I	
	17	Pos	Pos	I	94	P	93	P	93	P	P	115,0	P	120,8	P	120,9	P	P	I	
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	95	P	94	P	94	P	P	51,2	P	37,8	P	33,2	P	P	I	
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	88	P	92	P	87	P	P	56,2	P	29,2	P	30,7	P	P	I	
	12	Pos	Pos	I	91	P	93	P	91	P	P	31,6	P	33,9	P	35,9	P	P	I	
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	84	P	88	P	86	P	P	-7,1	N	11,4	P	12,1	P	P	I	
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	76	P	78	P	77	P	P	14,9	P	11,9	P	0,4	N	P	I	
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	97	P	96	P	96	P	P	12,6	P	16,6	P	15,3	P	P	I	
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	87	P	88	P	89	P	P	32,3	P	30,9	P	35,0	P	P	I	
C 1/1	7	Pos	Neg	V	97	P	95	P	97	P	P	-1,7	N	-3,3	N	7,6	N	N	V	
B 1/5	16	Pos	Neg	V	95	P	93	P	94	P	P	-0,3	N	13,2	P	0,3	N	N	V	
	24	Pos	Neg	V	91	P	94	P	93	P	P	3,7	N	6,1	N	6,2	N	N	V	
B 1/15	11	Pos	Neg	V	72	P	76	P	75	P	P	3,0	N	7,7	N	4,7	N	N	V	
D 1/1	19	Neg	Pos	I	43	N	47	N	44	N	N	128,8	P	148,4	P	141,4	P	P	I	
D 1/5	4	Neg	Pos	I	36	N	45	N	39	N	N	79,2	P	108,3	P	104,7	P	P	I	
D 1/30	22	Neg	Pos	I	36	N	32	N	38	N	N	18,8	P	17,0	P	17,9	P	P	I	
	27	Neg	Pos	I	31	N	27	N	38	N	N	18,9	P	16,5	P	19,1	P	P	I	
E 1/1	9	Neg	Neg	N	41	N	46	N	39	N	N	-5,5	N	1,0	N	-9,5	N	N	N	
F 1/1	5	Neg	Neg	N	49	N	55	N	58	N	N	11,3	P	3,6	N	-1,1	N	N	N	
G 1/1	13	Neg	Neg	N	56	N	50	N	61	N	N	13,2	P	26,1	P	15,6	P	P	I	
H 1/1	20	Neg	Neg	N	35	N	36	N	37	N	N	-1,9	N	0,5	N	1,6	N	N	N	
I 1/1	8	Neg	Neg	N	31	N	39	N	33	N	N	2,3	N	-0,7	N	5,6	N	N	N	
L 1/1	2	Neg	Neg	N	28	N	33	N	41	N	N	2,1	N	4,9	N	-0,6	N	N	N	
M 1/1	26	Neg	Neg	N	43	N	40	N	43	N	N	3,7	N	1,6	N	-0,7	N	N	N	
N 1/1	23	Neg	Neg	N	35	N	39	N	48	N	N	2,8	N	2,0	N	2,5	N	N	N	

Laboratorio N.2

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1						ELISA trapping 3ABC						Esito	Interpret	
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		Esito	Prova 1		Prova 2		Prova 3			
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% pos	results	% pos		results	% pos	results	% pos	results			Esito
A 1/1	1	Neg	Pos	I	52	N	55	N	70	P	N	64	P	72	P	59	P	P	Infetto no asia	
A 1/3	15	Neg	Pos	I	44	N	41	N	44	N	N	20	P	31	P	19	P	P	Infetto no asia	
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	94	P	95	P	92	P	P	141	P	113	P	129	P	P	I	
	17	Pos	Pos	I	93	P	95	P	93	P	P	148	P	112	P	135	P	P	I	
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	94	P	95	P	93	P	P	74	P	73	P	67	P	P	I	
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	89	P	89	P	84	P	P	50	P	37	P	44	P	P	I	
	12	Pos	Pos	I	88	P	89	P	87	P	P	34	P	53	P	29	P	P	I	
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	83	P	86	P	84	P	P	21	P	29	P	19	P	P	I	
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	74	P	76	P	80	P	P	25	P	37	P	21	P	P	I	
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	96	P	97	P	96	P	P	23	P	32	P	19	P	P	I	
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	87	P	86	P	86	P	P	28	P	25	P	24	P	P	I	
C 1/1	7	Pos	Neg	V	97	P	97	P	96	P	P	0	N	4	N	0	N	N	V	
B 1/5	16	Pos	Neg	V	90	P	91	P	88	P	P	8	N	2	N	10	P	N	V	
	24	Pos	Neg	V	89	P	91	P	91	P	P	1	N	4	N	17	P	N	V	
B 1/15	11	Pos	Neg	V	75	P	74	P	68	N	P	3	N	2	N	2	N	N	V	
D 1/1	19	Neg	Pos	I	41	N	39	N	42	N	N	157	P	115	P	136	P	P	Infetto no asia	
D 1/5	4	Neg	Pos	I	42	N	40	N	15	N	N	93	P	98	P	90	P	P	Infetto no asia	
D 1/30	22	Neg	Pos	I	30	N	29	N	10	N	N	23	P	36	P	19	P	P	Infetto no asia	
	27	Neg	Pos	I	32	N	31	N	36	N	N	30	P	33	P	27	P	P	Infetto no asia	
E 1/1	9	Neg	Neg	N	39	N	33	N	36	N	N	1	N	1	N	5	N	N	N	
F 1/1	5	Neg	Neg	N	60	N	58	N	47	N	N	1	N	1	N	10	P	N	N	
G 1/1	13	Neg	Neg	N	64	N	62	N	71	P	N	1	N	3	N	4	N	N	N	
H 1/1	20	Neg	Neg	N	32	N	27	N	33	N	N	6	N	4	N	19	P	N	N	
I 1/1	8	Neg	Neg	N	31	N	22	N	42	N	N	1	N	1	N	0	N	N	N	
L 1/1	2	Neg	Neg	N	38	N	32	N	37	N	N	2	N	1	N	0	N	N	N	
M 1/1	26	Neg	Neg	N	43	N	39	N	52	N	N	4	N	2	N	2	N	N	N	
N 1/1	23	Neg	Neg	N	42	N	39	N	50	N	N	1	N	3	N	2	N	N	N	

Laboratorio N.3

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1								ELISA trapping 3ABC								Interpret
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		C o s i l i	Prova 1		Prova 2		Prova 3		L i s i t o			
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% pos	results	% pos		results	% pos	results							
A 1/1	1	Neg	Pos	I	72	P	71	P	72	P	P	42	P	42	P	42	P	P	I			
A 1/3	15	Neg	Pos	I	37	N	37	N	38	N	N	11	P	11	P	11	P	P	I			
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	92	P	92	P	92	P	P	95	P	95	P	95	P	P	I			
	17	Pos	Pos	I	93	P	93	P	93	P	P	103	P	103	P	104	P	P	I			
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	94	P	94	P	94	P	P	58	P	57	P	58	P	P	I			
	10	Pos	Pos	I	89	P	89	P	89	P	P	30	P	30	P	30	P	P	I			
B 1/6 + D1/20	12	Pos	Pos	I	89	P	89	P	89	P	P	32	P	31	P	32	P	P	I			
	14	Pos	Pos	I	86	P	86	P	86	P	P	16	P	16	P	16	P	P	I			
B 1/9 + D1/30	25	Pos	Pos	I	75	P	76	P	76	P	P	19	P	19	P	19	P	P	I			
B 1/15 + D1/30	21	Pos	Pos	I	96	P	96	P	96	P	P	17	P	17	P	17	P	P	I			
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	87	P	86	P	87	P	P	19	P	19	P	19	P	P	I			
C 1/1	7	Pos	Neg	V	96	P	96	P	96	P	P	0	N	0	N	0	N	N	V			
B 1/5	16	Pos	Neg	V	91	P	91	P	92	P	P	1	N	1	N	1	N	N	V			
	24	Pos	Neg	V	89	P	89	P	89	P	P	4	N	4	N	4	N	N	V			
B 1/15	11	Pos	Neg	V	78	P	79	P	78	P	P	2	N	1	N	2	N	N	V			
D 1/1	19	Neg	Pos	I	37	N	36	N	37	N	N	103	P	103	P	103	P	P	I			
D 1/5	4	Neg	Pos	I	32	N	30	N	31	N	N	81	P	80	P	81	P	P	I			
	22	Neg	Pos	I	18	N	17	N	19	N	N	18	P	18	P	18	P	P	I			
D 1/30	27	Neg	Pos	I	25	N	24	N	26	N	N	18	P	18	P	18	P	P	I			
	9	Neg	Neg	N	34	N	33	N	33	N	N	0	N	0	N	0	N	N	N			
E 1/1	9	Neg	Neg	N	34	N	33	N	33	N	N	0	N	0	N	0	N	N	N			
F 1/1	5	Neg	Neg	N	55	N	54	N	55	N	N	2	N	1	N	2	N	N	N			
G 1/1	13	Neg	Neg	N	72	P	72	P	72	P	P	1	N	1	N	1	N	N	V			
H 1/1	20	Neg	Neg	N	33	N	32	N	33	N	N	3	N	2	N	3	N	N	N			
I 1/1	8	Neg	Neg	N	30	N	28	N	29	N	N	1	N	2	N	1	N	N	N			
L 1/1	2	Neg	Neg	N	43	N	42	N	43	N	N	0	N	0	N	0	N	N	N			
M 1/1	26	Neg	Neg	N	40	N	40	N	41	N	N	1	N	1	N	1	N	N	N			
N 1/1	23	Neg	Neg	N	46	N	46	N	47	N	N	2	N	2	N	2	N	N	N			

Laboratorio N.4

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1								ELISA trapping 3ABC								Interpret
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		C o s i l i	Prova 1		Prova 2		Prova 3		L i s i t o			
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% pos	results	% pos		results	% pos	results							
A 1/1	1	Neg	Pos	I	65	N	61	N	53	N	N	83	P	75	P	69	P	P	I			
A 1/3	15	Neg	Pos	I	46	N	47	N	53	N	N	33	P	16	P	18	P	P	I			
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	93	P	91	P	93	P	P	134	P	126	P	145	P	P	o Asia1 + V			
	17	Pos	Pos	I	93	P	90	P	93	P	P	129	P	127	P	147	P	P	o Asia1 + V			
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	93	P	91	P	93	P	P	86	P	58	P	76	P	P	o Asia1 + V			
	10	Pos	Pos	I	91	P	85	P	89	P	P	50	P	27	P	30	P	P	o Asia1 + V			
B 1/6 + D1/20	12	Pos	Pos	I	90	P	85	P	89	P	P	65	P	30	P	35	P	P	o Asia1 + V			
	14	Pos	Pos	I	87	P	81	P	87	P	P	37	P	21	P	16	P	P	o Asia1 + V			
B 1/9 + D1/30	25	Pos	Pos	I	85	P	76	P	71	P	P	38	P	17	P	12	P	P	o Asia1 + V			
B 1/15 + D1/30	21	Pos	Pos	I	97	P	96	P	96	P	P	34	P	20	P	16	P	P	o Asia1 + V			
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	92	P	87	P	91	P	P	39	P	16	P	21	P	P	o Asia1 + V			
C 1/1	7	Pos	Neg	V	97	P	96	P	96	P	P	5	N	2	N	3	N	N	V			
B 1/5	16	Pos	Neg	V	92	P	90	P	92	P	P	2	N	1	N	1	N	N	V			
	24	Pos	Neg	V	93	P	89	P	92	P	P	0	N	0	N	0	N	N	V			
B 1/15	11	Pos	Neg	V	79	P	73	P	77	P	P	2	N	1	N	1	N	N	V			
D 1/1	19	Neg	Pos	I	47	N	39	N	52	N	N	120	P	140	P	133	P	P	I			
D 1/5	4	Neg	Pos	I	47	N	37	N	48	N	N	102	P	90	P	97	P	P	I			
	22	Neg	Pos	I	51	N	32	N	45	N	N	35	P	17	P	16	P	P	I			
D 1/30	27	Neg	Pos	I	49	N	36	N	76	N	N	31	P	16	P	11	P	P	I			
	9	Neg	Neg	N	49	N	47	N	52	N	N	0	N	0	N	0	N	N	N			
E 1/1	9	Neg	Neg	N	49	N	47	N	52	N	N	0	N	0	N	0	N	N	N			
F 1/1	5	Neg	Neg	N	58	N	59	N	69	N	N	2	N	1	N	2	N	N	N			
G 1/1	13	Neg	Neg	N	59	N	61	N	52	N	N	0	N	0	N	0	N	N	N			
H 1/1	20	Neg	Neg	N	41	N	36	N	39	N	N	3	N	1	N	1	N	N	N			
I 1/1	8	Neg	Neg	N	40	N	39	N	39	N	N	1	N	0	N	0	N	N	N			
L 1/1	2	Neg	Neg	N	39	N	33	N	50	N	N	1	N	0	N	1	N	N	N			
M 1/1	26	Neg	Neg	N	55	N	46	N	55	N	N	1	N	0	N	0	N	N	N			
N 1/1	23	Neg	Neg	N	52	N	46	N	56	N	N	2	N	1	N	1	N	N	N			

Laboratorio N.5

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1							ELISA trapping 3ABC							Interpret
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		ESU	Prova 1		Prova 2		Prova 3		ESU	
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% pos	results	% pos		results	% pos	results					
A 1/1	1	Neg	Pos	I	83	P	75	P	78	P	P	66	P	60	P	51	P	P	I	
A 1/3	15	Neg	Pos	I	68	N	52	N	46	N	N	36	P	45	P	47	P	P	I	
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	92	P	91	P	90	P	P	104	P	105	P	92	P	P	I	
	17	Pos	Pos	I	93	P	90	P	91	P	P	92	P	90	P	91	P	P	I	
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	92	P	89	P	90	P	P	48	P	67	P	49	P	P	I	
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	83	P	84	P	84	P	P	51	P	38	P	40	P	P	I	
	12	Pos	Pos	I	83	P	89	P	86	P	P	52	P	34	P	34	P	P	I	
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	93	P	84	P	78	P	P	27	P	57	P	21	P	P	I	
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	86	P	74	P	77	P	P	45	P	68	P	46	P	P	I	
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	95	P	96	P	96	P	P	45	P	64	P	35	P	P	I	
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	92	P	82	P	81	P	P	58	P	35	P	22	P	P	I	
C 1/1	7	Pos	Neg	V	93	P	96	P	97	P	P	11	P	13	P	14	P	P	I	
B 1/5	16	Pos	Neg	V	95	P	88	P	86	P	P	2	N	1	N	2	N	N	V	
	24	Pos	Neg	V	83	P	87	P	86	P	P	3	N	2	N	2	N	N	V	
B 1/15	11	Pos	Neg	V	72	P	75	P	72	P	P	2	N	2	N	3	N	N	V	
D 1/1	19	Neg	Pos	I	44	N	43	N	53	N	N	83	P	83	P	95	P	P	I	
D 1/5	4	Neg	Pos	I	55	N	54	N	47	N	N	89	P	91	P	90	P	P	I	
D 1/30	22	Neg	Pos	I	32	N	38	N	41	N	N	39	P	29	P	38	P	P	I	
	27	Neg	Pos	I	66	N	38	N	33	N	N	34	P	54	P	40	P	P	I	
E 1/1	9	Neg	Neg	N	33	N	55	N	58	N	N	5	N	0	N	3	N	N	N	
F 1/1	5	Neg	Neg	N	61	N	64	N	64	N	N	4	N	5	N	3	N	N	N	
G 1/1	13	Neg	Neg	N	86	P	76	P	78	P	P	8	N	5	N	7	N	N	V	
H 1/1	20	Neg	Neg	N	43	N	46	N	47	N	N	4	N	1	N	3	N	N	N	
I 1/1	8	Neg	Neg	N	42	N	47	N	41	N	N	6	N	2	N	1	N	N	N	
L 1/1	2	Neg	Neg	N	65	N	55	N	46	N	N	28	P	29	P	21	P	P	I	
M 1/1	26	Neg	Neg	N	77	P	87	P	73	P	P	7	N	4	N	6	N	N	V	
N 1/1	23	Neg	Neg	N	40	N	51	N	52	N	N	4	N	8	N	5	N	N	N	

Laboratorio N.6

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1							ELISA trapping 3ABC							Interpret
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		ESU	Prova 1		Prova 2		Prova 3		ESU	
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% pos	results	% pos		results	% pos	results					
A 1/1	1	Neg	Pos	I	63	N	60	N	64	N	N	41	P	46	P	50	P	P	I	
A 1/3	15	Neg	Pos	I	54	N	47	N	46	N	N	21	P	23	P	33	P	P	I	
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	95	P	95	P	94	P	P	132	P	131	P	145	P	P	I	
	17	Pos	Pos	I	95	P	95	P	95	P	P	137	P	142	P	154	P	P	I	
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	95	P	95	P	95	P	P	46	P	45	P	56	P	P	I	
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	91	P	91	P	91	P	P	30	P	28	P	27	P	P	I	
	12	Pos	Pos	I	91	P	90	P	91	P	P	29	P	25	P	33	P	P	I	
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	89	P	85	P	84	P	P	19	P	13	P	20	P	P	I	
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	82	P	72	P	77	P	P	17	P	11	P	17	P	P	I	
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	96	P	96	P	96	P	P	19	P	19	P	25	P	P	I	
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	92	P	92	P	91	P	P	19	P	18	P	21	P	P	I	
C 1/1	7	Pos	Neg	V	97	P	97	P	97	P	P	3	N	0	N	3	N	N	V	
B 1/5	16	Pos	Neg	V	94	P	92	P	92	P	P	3	N	1	N	2	N	N	V	
	24	Pos	Neg	V	93	P	93	P	91	P	P	5	N	2	N	3	N	N	V	
B 1/15	11	Pos	Neg	V	81	P	69	N	75	P	P	4	N	2	N	2	N	N	V	
D 1/1	19	Neg	Pos	I	46	N	50	N	39	N	N	142	P	150	P	164	P	P	I	
D 1/5	4	Neg	Pos	I	46	N	39	N	41	N	N	92	P	79	P	95	P	P	I	
D 1/30	22	Neg	Pos	I	31	N	37	N	25	N	N	23	P	20	P	26	P	P	I	
	27	Neg	Pos	I	38	N	30	N	36	N	N	18	P	21	P	27	P	P	I	
E 1/1	9	Neg	Neg	N	46	N	43	N	39	N	N	2	N	1	N	2	N	N	N	
F 1/1	5	Neg	Neg	N	63	N	64	N	58	N	N	4	N	5	N	3	N	N	N	
G 1/1	13	Neg	Neg	N	63	N	58	N	60	N	N	4	N	4	N	0	N	N	N	
H 1/1	20	Neg	Neg	N	39	N	46	N	33	N	N	6	N	3	N	2	N	N	N	
I 1/1	8	Neg	Neg	N	41	N	44	N	34	N	N	2	N	3	N	0	N	N	N	
L 1/1	2	Neg	Neg	N	39	N	41	N	35	N	N	4	N	2	N	4	N	N	N	
M 1/1	26	Neg	Neg	N	52	N	44	N	50	N	N	5	N	5	N	4	N	N	N	
N 1/1	23	Neg	Neg	N	45	N	47	N	34	N	N	4	N	1	N	5	N	N	N	

Laboratorio N.7

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1								ELISA trapping 3ABC								Interpret	
		Asia 1	3ABC	%		comp	results	%	comp	results	%	comp	results	%	pos	results	%	pos	results	%	pos		results
A 1/1	1	Neg	Pos	I	65	N	60	N	71	P	N	42	P	52	P	50	P	P	I				
A 1/3	15	Neg	Pos	I	45	N	47	N	41	N	N	19	P	18	P	13	P	P	I				
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	94	P	94	P	94	P	P	102	P	116	P	120	P	P	I				
	17	Pos	Pos	I	95	P	95	P	94	P	P	108	P	125	P	120	P	P	I				
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	93	P	94	P	94	P	P	53	P	55	P	46	P	P	I				
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	88	P	93	P	91	P	P	26	P	34	P	24	P	P	I				
	12	Pos	Pos	I	92	P	89	P	90	P	P	28	P	35	P	24	P	P	I				
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	89	P	86	P	87	P	P	15	P	18	P	15	P	P	I				
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	73	P	73	P	71	P	P	16	P	22	P	15	P	P	I				
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	96	P	97	P	97	P	P	14	P	24	P	17	P	P	I				
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	81	P	86	P	87	P	P	19	P	21	P	16	P	P	I				
C 1/1	7	Pos	Neg	V	96	P	96	P	95	P	P	2	N	2	N	3	N	N	V				
	16	Pos	Neg	V	94	P	93	P	93	P	P	2	N	1	N	4	N	N	V				
B 1/5	24	Pos	Neg	V	91	P	91	P	90	P	P	1	N	1	N	2	N	N	V				
	11	Pos	Neg	V	81	P	83	P	81	P	P	2	N	1	N	4	N	N	V				
D 1/1	19	Neg	Pos	I	50	N	52	N	53	N	N	128	P	127	P	127	P	P	I				
D 1/5	4	Neg	Pos	I	61	N	58	N	48	N	N	72	P	100	P	79	P	P	I				
D 1/30	22	Neg	Pos	I	42	N	53	N	43	N	N	14	P	17	P	18	P	P	I				
	27	Neg	Pos	I	30	N	7	N	21	N	N	18	P	21	P	18	P	P	I				
E 1/1	9	Neg	Neg	N	52	N	66	N	54	N	N	2	N	1	N	0	N	N	N				
F 1/1	5	Neg	Neg	N	63	N	69	N	58	N	N	6	N	3	N	1	N	N	N				
G 1/1	13	Neg	Neg	N	66	N	55	N	66	N	N	3	N	2	N	2	N	N	N				
H 1/1	20	Neg	Neg	N	45	N	32	N	50	N	N	4	N	3	N	3	N	N	N				
I 1/1	8	Neg	Neg	N	57	N	59	N	47	N	N	2	N	1	N	2	N	N	N				
L 1/1	2	Neg	Neg	N	45	N	37	N	50	N	N	4	N	1	N	3	N	N	N				
M 1/1	26	Neg	Neg	N	53	N	33	N	40	N	N	5	N	2	N	1	N	N	N				
N 1/1	23	Neg	Neg	N	44	N	42	N	51	N	N	7	N	3	N	1	N	N	N				

Laboratorio N.8

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1								ELISA trapping 3ABC								Interpret	
		Asia 1	3ABC	%		comp	results	%	comp	results	%	comp	results	%	pos	results	%	pos	results	%	pos		results
A 1/1	1	Neg	Pos	I	70	P	72	P	77	P	P	36	P	50	P	nd	nd	P	I				
A 1/3	15	Neg	Pos	I	62	N	66	N	57	N	N	-3	N	1	N	nd	nd	N	N				
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	93	P	94	P	94	P	P	120	P	126	P	nd	nd	P	I				
	17	Pos	Pos	I	93	P	94	P	94	P	P	120	P	101	P	nd	nd	P	I				
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	93	P	94	P	94	P	P	32	P	41	P	nd	nd	P	I				
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	92	P	93	P	87	P	P	27	P	28	P	nd	nd	P	I				
	12	Pos	Pos	I	92	P	93	P	91	P	P	19	P	18	P	nd	nd	P	I				
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	90	P	90	P	91	P	P	21	P	13	P	nd	nd	P	I				
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	86	P	80	P	87	P	P	22	P	13	P	nd	nd	P	I				
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	95	P	95	P	94	P	P	15	P	24	P	nd	nd	P	I				
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	92	P	93	P	91	P	P	26	P	21	P	nd	nd	P	I				
C 1/1	7	Pos	Neg	V	94	P	95	P	95	P	P	-1	N	2	N	nd	nd	N	V				
	16	Pos	Neg	V	93	P	94	P	90	P	P	-1	N	-3	N	nd	nd	N	V				
B 1/5	24	Pos	Neg	V	93	P	93	P	91	P	P	1	N	0	N	nd	nd	N	V				
	11	Pos	Neg	V	85	P	85	P	82	P	P	-1	N	4	N	nd	nd	N	V				
D 1/1	19	Neg	Pos	I	66	N	60	N	55	N	N	122	P	118	P	nd	nd	P	I				
D 1/5	4	Neg	Pos	I	52	N	48	N	47	N	N	52	P	75	P	nd	nd	P	I				
D 1/30	22	Neg	Pos	I	45	N	44	N	38	N	N	20	P	18	P	nd	nd	P	I				
	27	Neg	Pos	I	58	N	54	N	42	N	N	8	N	14	P	nd	nd	P	I				
E 1/1	9	Neg	Neg	N	55	N	64	N	53	N	N	4	N	-1	N	nd	nd	N	N				
F 1/1	5	Neg	Neg	N	67	N	68	N	66	N	N	4	N	4	N	nd	nd	N	N				
G 1/1	13	Neg	Neg	N	75	P	74	P	82	P	P	0	N	2	N	nd	nd	N	V				
H 1/1	20	Neg	Neg	N	60	N	61	N	53	N	N	1	N	1	N	nd	nd	N	N				
I 1/1	8	Neg	Neg	N	42	N	63	N	39	N	N	4	N	-3	N	nd	nd	N	N				
L 1/1	2	Neg	Neg	N	58	N	63	N	61	N	N	-4	N	2	N	nd	nd	N	N				
M 1/1	26	Neg	Neg	N	67	N	68	N	69	N	N	3	N	4	N	nd	nd	N	N				
N 1/1	23	Neg	Neg	N	62	N	64	N	58	N	N	-1	N	2	N	nd	nd	N	N				

Laboratorio N.9

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1								ELISA trapping 3ABC								Interpret
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		O U S E	Prova 1		Prova 2		Prova 3		Esito			
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% comp	results	% pos		results	% pos	results	% pos	results					
A 1/1	1	Neg	Pos	I	50	N	53	N	45	N	N	64	P	54	P	62	P	P	I			
A 1/3	15	Neg	Pos	I	20	N	47	N	20	N	N	29	P	23	P	31	P	P	I			
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	90	P	91	P	90	P	P	105	P	95	P	94	P	P	I			
	17	Pos	Pos	I	90	P	90	P	90	P	P	109	P	95	P	96	P	P	I			
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	91	P	91	P	90	P	P	47	P	46	P	58	P	P	I			
	10	Pos	Pos	I	87	P	86	P	84	P	P	39	P	18	P	38	P	P	I			
B 1/6 + D1/20	12	Pos	Pos	I	85	P	88	P	87	P	P	19	P	37	P	40	P	P	I			
	14	Pos	Pos	I	75	P	81	P	76	P	P	21	P	11	P	36	P	P	I			
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	75	P	81	P	76	P	P	21	P	11	P	36	P	P	I			
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	86	P	70	P	82	P	P	26	P	24	P	25	P	P	I			
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	95	P	94	P	94	P	P	22	P	17	P	21	P	P	I			
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	78	P	82	P	76	P	P	22	P	14	P	25	P	P	I			
C 1/1	7	Pos	Neg	V	93	P	95	P	95	P	P	5	N	1	N	7	N	N	V			
	16	Pos	Neg	V	87	P	89	P	85	P	P	5	N	2	N	3	N	N	V			
B 1/5	24	Pos	Neg	V	85	P	85	P	84	P	P	6	N	2	N	1	N	N	V			
	11	Pos	Neg	V	61	N	68	N	60	N	N	6	N	1	N	1	N	N	N			
D 1/1	19	Neg	Pos	I	19	N	36	N	30	N	N	94	P	93	P	90	P	P	I			
D 1/5	4	Neg	Pos	I	24	N	73	N	26	N	N	96	P	94	P	99	P	P	I			
	22	Neg	Pos	I	29	N	34	N	41	N	N	27	P	22	P	33	P	P	I			
D 1/30	27	Neg	Pos	I	47	N	44	N	44	N	N	24	P	19	P	25	P	P	I			
	9	Neg	Neg	N	36	N	37	N	30	N	N	3	N	4	N	1	N	N	N			
E 1/1	9	Neg	Neg	N	36	N	37	N	30	N	N	3	N	4	N	1	N	N	N			
F 1/1	5	Neg	Neg	N	49	N	53	N	49	N	N	6	N	4	N	1	N	N	N			
G 1/1	13	Neg	Neg	N	65	N	64	N	60	N	N	4	N	5	N	1	N	N	N			
H 1/1	20	Neg	Neg	N	41	N	48	N	33	N	N	2	N	1	N	6	N	N	N			
I 1/1	8	Neg	Neg	N	26	N	39	N	30	N	N	3	N	1	N	1	N	N	N			
L 1/1	2	Neg	Neg	N	41	N	32	N	69	N	N	4	N	3	N	6	N	N	N			
M 1/1	26	Neg	Neg	N	35	N	48	N	29	N	N	9	N	5	N	5	N	N	N			
N 1/1	23	Neg	Neg	N	24	N	42	N	29	N	N	8	N	1	N	9	N	N	N			

Laboratorio N.10

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1								ELISA trapping 3ABC								Interpret
		Asia 1		3ABC		Prova 1		Prova 2		Prova 3		O U S E	Prova 1		Prova 2		Prova 3		Esito			
		% comp	results	% comp		results	% comp	results	% comp	results	% pos		results	% pos	results	% pos	results					
A 1/1	1	Neg	Pos	I	84	P	82	P	86	P	P	58	P	59	P	74	P	P	I			
A 1/3	15	Neg	Pos	I	62	N	63	N	64	N	N	20	P	21	P	20	P	P	I			
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	91	P	91	P	91	P	P	107	P	99	P	113	P	P	I			
	17	Pos	Pos	I	90	P	91	P	90	P	P	112	P	116	P	117	P	P	I			
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	90	P	91	P	91	P	P	45	P	49	P	68	P	P	I			
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	87	P	88	P	88	P	P	28	P	32	P	38	P	P	I			
	12	Pos	Pos	I	88	P	89	P	89	P	P	27	P	26	P	38	P	P	I			
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	84	P	85	P	87	P	P	18	P	21	P	24	P	P	I			
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	78	P	79	P	63	N	P	24	P	24	P	38	P	P	I			
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	93	P	93	P	93	P	P	21	P	28	P	30	P	P	I			
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	80	P	86	P	86	P	P	27	P	14	P	25	P	P	I			
C 1/1	7	Pos	Neg	V	93	P	93	P	93	P	P	3	N	3	N	5	N	N	V			
B 1/5	16	Pos	Neg	V	88	P	70	P	66	N	P	0	N	2	N	0	N	N	V			
	24	Pos	Neg	V	91	P	91	P	91	P	P	2	N	2	N	2	N	N	V			
B 1/15	11	Pos	Neg	V	84	P	78	P	82	P	P	1	N	1	N	3	N	N	V			
D 1/1	19	Neg	Pos	I	52	N	51	N	59	N	N	112	P	125	P	125	P	P	I			
D 1/5	4	Neg	Pos	I	36	N	29	N	31	N	N	74	P	77	P	95	P	P	I			
D 1/30	22	Neg	Pos	I	16	N	25	N	8	N	N	14	P	14	P	25	P	P	I			
	27	Neg	Pos	I	22	N	29	N	14	N	N	26	P	36	P	30	P	P	I			
E 1/1	9	Neg	Neg	N	65	N	63	N	63	N	N	0	N	0	N	1	N	N	N			
F 1/1	5	Neg	Neg	N	79	P	76	P	78	P	P	1	N	1	N	1	N	N	V			
G 1/1	13	Neg	Neg	N	84	P	86	P	86	P	P	4	N	1	N	2	N	N	V			
H 1/1	20	Neg	Neg	N	48	N	52	N	50	N	N	2	N	3	N	3	N	N	N			
I 1/1	8	Neg	Neg	N	55	N	52	N	54	N	N	0	N	1	N	1	N	N	N			
L 1/1	2	Neg	Neg	N	57	N	63	N	52	N	N	1	N	1	N	3	N	N	N			
M 1/1	26	Neg	Neg	N	62	N	72	P	61	N	N	3	N	3	N	2	N	N	N			
N 1/1	23	Neg	Neg	N	60	N	64	N	62	N	N	0	N	0	N	2	N	N	N			

Laboratorio N.12

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1						ELISA trapping 3ABC						Interpret							
		Asia 1	3ABC	%		comp	results	%	comp	results	%	comp	results	Esito	%	pos	results		%	pos	results	%	pos	results	Esito
A 1/1	1	Neg	Pos	I	77	P	60	N	61	N	NON RIPORTATO ESITO FINALE	DATI OTTENUTI NON UTILIZZABILI	NON POSSIBILE FORNIRE INTERPRETAZIONE												
A 1/3	15	Neg	Pos	I	33	N	38	N	38	N															
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	93	P	93	P	93	P															
	17	Pos	Pos	I	93	P	93	P	93	P															
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	93	P	93	P	93	P															
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	87	P	88	P	88	P															
	12	Pos	Pos	I	86	P	88	P	89	P															
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	81	P	83	P	83	P															
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	73	P	73	P	74	P															
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	95	P	96	P	97	P															
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	82	P	86	P	88	P															
C 1/1	7	Pos	Neg	V	95	P	96	P	97	P															
	16	Pos	Neg	V	87	P	90	P	89	P															
B 1/5	24	Pos	Neg	V	89	P	90	P	91	P															
	11	Pos	Neg	V	74	P	73	P	74	P															
D 1/1	19	Neg	Pos	I	42	N	39	N	37	N															
D 1/5	4	Neg	Pos	I	21	N	31	N	30	N															
D 1/30	22	Neg	Pos	I	17	N	29	N	29	N															
	27	Neg	Pos	I	31	N	31	N	23	N															
E 1/1	9	Neg	Neg	N	72	P	43	N	47	N															
F 1/1	5	Neg	Neg	N	68	N	57	N	56	N															
G 1/1	13	Neg	Neg	N	61	N	61	N	61	N															
H 1/1	20	Neg	Neg	N	27	N	35	N	31	N															
I 1/1	8	Neg	Neg	N	23	N	34	N	35	N															
L 1/1	2	Neg	Neg	N	35	N	37	N	37	N															
M 1/1	26	Neg	Neg	N	32	N	43	N	42	N															
N 1/1	23	Neg	Neg	N	38	N	41	N	45	N															

Laboratorio N.13

	id	Esito atteso			Stato	ELISA competitiva Asia 1						ELISA trapping 3ABC						Interpret							
		Asia 1	3ABC	%		comp	results	%	comp	results	%	comp	results	Esito	%	pos	results		%	pos	results	%	pos	results	Esito
A 1/1	1	Neg	Pos	I	62,2	N	31,4	N	55,9	N	N	35,7	P	45,9	P	47,4	P	P	Infetto no asia 1						
A 1/3	15	Neg	Pos	I	45,7	N	13,8	N	37,5	N	N	14,2	P	17,3	P	17	P	P	Infetto no asia 1						
B 1/1 + D1/1	3	Pos	Pos	I	94	P	94	P	95,5	P	P	138	P	124,52	P	109,8	P	P	I						
	17	Pos	Pos	I	95,5	P	95	P	96,3	P	P	115	P	112,8	P	113	P	P	I						
B 1/3 + D1/10	6	Pos	Pos	I	94	P	92,3	P	92	P	P	70	P	70,6	P	45	P	P	I						
B 1/6 + D1/20	10	Pos	Pos	I	90,4	P	87	P	90,2	P	P	25,1	P	34,8	P	36,4	P	P	I						
	12	Pos	Pos	I	90,2	P	85	P	88,5	P	P	22,3	P	41,9	P	32	P	P	I						
B 1/9 + D1/30	14	Pos	Pos	I	85,5	P	78,5	P	82,3	P	P	11,8	P	19,1	P	16,8	P	P	I						
B 1/15 + D1/30	25	Pos	Pos	I	81	P	72	P	75,4	P	P	22	P	15	P	21,5	P	P	I						
C 1/1 + D1/30	21	Pos	Pos	I	97,4	P	97,2	P	97,4	P	P	26	P	31,9	P	15,1	P	P	I						
C 1/30 + D1/30	18	Pos	Pos	I	87,3	P	87,4	P	89,7	P	P	18,2	P	27,6	P	11,5	P	P	I						
C 1/1	7	Pos	Neg	V	96	P	97,5	P	96	P	P	0,7	N	2	N	-2,2	N	N	V						
	16	Pos	Neg	V	91,4	P	82,8	P	92,5	P	P	2	N	0,9	N	1,5	N	N	V						
B 1/5	24	Pos	Neg	V	90,4	P	85	P	90,8	P	P	0,1	N	0,5	N	-0,4	N	N	V						
	11	Pos	Neg	V	82	P	75	P	85	P	P	24	N	1,6	N	1,2	N	N	V						
D 1/1	19	Neg	Pos	I	42,8	N	29,8	N	37	N	N	121,1	P	114,2	P	136,9	P	P	Infetto no asia 1						
D 1/5	4	Neg	Pos	I	41	N	31,3	N	33	N	N	92	P	96,6	P	74,3	P	P	Infetto no asia 1						
D 1/30	22	Neg	Pos	I	33,4	N	11,8	N	22	N	N	22	P	37,9	P	12,5	P	P	Infetto no asia 1						
	27	Neg	Pos	I	31,5	N	15,5	N	25	N	N	24	P	26,5	P	15,9	P	P	Infetto no asia 1						
E 1/1	9	Neg	Neg	N	49,8	N	32,5	N	42,1	N	N	0,2	N	1	N	-1	N	N	N						
F 1/1	5	Neg	Neg	N	58,2	N	24,4	N	51,6	N	N	1,3	N	2,1	N	0,7	N	N	N						
G 1/1	13	Neg	Neg	N	58,7	N	32,2	N	57,6	N	N	0,8	N	1,5	N	0,3	N	N	N						
H 1/1	20	Neg	Neg	N	24,9	N	11,2	N	31,4	N	N	6,7	N	5,8	N	0,3	N	N	N						
I 1/1	8	Neg	Neg	N	30,2	N	20,1	N	35,2	N	N	0,4	N	2	N	-1,7	N	N	N						
L 1/1	2	Neg	Neg	N	41,1	N	14,4	N	26,9	N	N	0,4	N	3,2	N	-0,4	N	N	N						
M 1/1	26	Neg	Neg	N	31,3	N	14,1	N	38,5	N	N	7,5	N	5,6	N	0,1	N	N	N						
N 1/1	23	Neg	Neg	N	33,6	N	9,9	N	37,6	N	N	1,9	N	3,5	N	1	N	N	N						

Osservazioni

Nelle istruzioni allegate al layout di presentazione dei risultati era richiesto di “ripetere l’esecuzione delle prove per tre volte”, riportando il dettaglio dell’operatore e il giorno dell’esecuzione delle reazioni.

I Laboratori hanno interpretato l’indicazione in modo differente adottando comportamenti difformi. La Tabella successiva riassume le modalità di esecuzione delle prove (operatore e giorno di esecuzione) nei diversi Laboratori.

LAB. N.	ELISA 3ABC		SPCE-FMDV Asia 1	
	gg.	operatore	gg.	operatore
1	ni	ni	ni	ni
2	≠	≠	≠	≠
3	≠	≠	≠	=
4	≠	ni	≠	ni
5	=	≠	=	≠
6	=	≠	=	≠
7	≠	=	≠	=
8	=	ni	≠	ni
9	=	=	ni	ni
10	≠	=	≠	=
12	reazione non valida		≠	≠
13	≠	≠	≠	≠

Legenda: ≠ : operatore e/o giorno di esecuzione prova diversi;
 = : stesso operatore e/o stesso giorno di esecuzione prova;
 ni : non indicato

Si sono verificati quattro possibili modi di procedere:

1. Prove eseguite da operatori diversi in giorni diversi
2. Prove eseguite dallo stesso operatore in giorni diversi
3. Prove eseguite da operatori diversi lo stesso giorno
4. Prove eseguite dallo stesso operatore lo stesso giorno

Valutando criticamente le quattro condizioni si può considerare che solo le modalità 1 e 2 sono conformi alla richiesta.

Può essere ritenuta conforme anche la modalità 3 solo se gli operatori agiscono in modo indipendente, dalla fase di adsorbimento fino allo sviluppo, non utilizzando nessun reagente in comune (tranne le soluzioni tampone) tra diversi operatori. Diversamente le tre prove sono da considerarsi TRE REPLICHE DELLA STESSA PROVA e non LA STESSA PROVA ESEGUITA TRE VOLTE. Il rischio che si verifica operando in questo modo è che, non introducendo la variabile giorno, l’eventuale errore su un campione si ripete sistematicamente nelle tre prove.

Evidentemente, la modalità di procedere 4 è scorretta poiché tre prove eseguite lo stesso giorno dallo stesso operatore corrispondono a tre repliche degli stessi campioni in un’unica prova, non a tre prove indipendenti. In queste condizioni la probabilità di ripetere un eventuale errore è massima.