



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

Via Bianchi 9 - 25124 Brescia



CENTRO NAZIONALE DI RIFERENZA 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

RISULTATI DEL RING TEST 2007

*ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi verso
Malattia Vescicolare del Suino*

**Laboratori partecipanti: N. 11 Istituti Zooprofilattici Sperimentali e
N. 2 sezioni della Lombardia**

IZS	Referente
IZS PLV, TORINO	M.S. Gennero
IZS VE, LEGNARO, PD	S. Nardelli
IZS LT, ROMA	M. T. Scicluna
IZS UM, PERUGIA	S. Costarelli
IZS AM, TERAMO	M. Tittarelli
IZS PB, FOGGIA	N. Cavaliere
IZS ME, PORTICI, NA	Di Sarno
IZS CATANZARO	L. Ciambrone
IZS SI, PALERMO	G. Purpari
IZS SA, SASSARI	A. Oggiano
IZS LER, Sez. CREMONA	M. Boldini
IZS LER, Sez. MANTOVA	A. Nigrelli
IZS LER, BRESCIA, CERVES	S. Grazioli

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 3
MATERIALI E METODI	Pag. 3
• <i>Prova</i>	Pag. 3
• <i>Composizione del pannello di sieri</i>	
• <i>Reagenti</i>	Pag. 4
• <i>Criteri di interpretazione</i>	Pag. 4
• <i>Riservatezza</i>	Pag. 4
ANALISI DEI DATI OTTENUTI CON I REAGENTI e le condizioni standard	
• <i>RISULTATI</i>	Pag. 6
<i>Valutazione dei controlli della reazione</i>	Pag. 6
<i>Controllo Antigene</i>	Pag. 6
<i>Siero Controllo fortemente positivo</i>	Pag. 7
<i>Siero di Referenza</i>	Pag. 7
<i>Siero di Controllo negativo</i>	Pag. 8
<i>Valutazione dei risultati forniti dagli 11 Laboratori per i 25 sieri in esame</i>	Pag. 9
<i>Conclusione</i>	Pag. 11
ANALISI DEI DATI OTTENUTI CON IL KIT STABILIZZATO	
• <i>PREMESSA</i>	Pag. 13
• <i>RISULTATI</i>	Pag. 13
<i>Valutazione dei controlli della reazione</i>	Pag. 13
<i>Controllo Antigene</i>	Pag. 13
<i>Siero Controllo fortemente positivo</i>	Pag. 14
<i>Siero di Referenza</i>	Pag. 14
<i>Siero di Controllo negativo</i>	Pag. 14
<i>Valutazione dei risultati forniti dagli 11 Laboratori per i 25 sieri in esame</i>	Pag. 15
<i>Confronto risultati ottenuti con reagenti routine e kit pronto uso</i>	Pag. 17

INTRODUZIONE

Dal 1995 il Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari (CERVES) produce e distribuisce agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali i reagenti per l'esecuzione del test ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi della Malattia Vescicolare del Suino (MVS), utilizzato come metodo di screening nel Piano Nazionale di sorveglianza/eradicazione.

Il metodo, sviluppato nell'ambito del CERVES (1, 2) corrisponde al test prescritto dalla normativa europea (4) e dall'OIE (3).

L'infezione sostenuta dal virus della MVS è presente nel territorio nazionale soprattutto nelle regioni non accreditate, ma ondate epidemiche di gravi conseguenze sanitarie ed economiche hanno interessato anche regioni accreditate; le più recenti sono state quelle verificatesi in Lombardia nell'arco di un anno (ottobre 2006-ottobre 2007) e quelle che hanno coinvolto regioni dell'Italia centrale sia nel 2007 che nel 2008.

In considerazione dell'evoluzione in forma subclinica dell'infezione nella maggioranza dei focolai il monitoraggio sierologico continuo negli allevamenti riveste considerevole importanza per l'efficacia del Piano di eradicazione. L'esecuzione del test di screening è demandata agli IZZSS territorialmente competenti; pertanto la verifica della performance diagnostica dei laboratori incaricati rappresenta una azione necessaria per assicurare uno standard operativo omogeneo e coordinare l'eventuale necessità di azioni correttive.

Prove inter-laboratorio con questi scopi sono organizzate dal CERVES con cadenza generalmente biennale. Per la prova inter-laboratorio organizzata nel biennio 2007-2008 è stato costruito un pannello di 25 sieri, contenente il 20% di campioni negativi di campo per valutare la specificità ed una prevalenza di campioni positivi per privilegiare la verifica della sensibilità. Questi ultimi sono stati disegnati per la valutazione sia della sensibilità analitica, attraverso la presenza di campione corrispondenti a concentrazioni decrescenti di anticorpi, che della sensibilità diagnostica, attraverso la presenza di campioni rappresentativi di diverse fasi dell'infezione.

L'IZSLER ha sviluppato la tecnologia per trasformare in kit pronto-uso alcuni test ELISA home-made, al fine di rendere più robusti i test, riducendo le fonti di variabilità, e semplificarne l'esecuzione, fornendo piastre già sensibilizzate e predisposte per la distribuzione dei campioni.

Pertanto, un altro e nuovo obiettivo del ring test 2007-2008 è stata la valutazione dei risultati, generati sullo stesso pannello di sieri con la medesima prova ELISA per la sierologia MVS, ma eseguita utilizzando il kit ELISA stabilizzato prodotto dall'IZSLER.

MATERIALI E METODI

Prova

Test ELISA competizione per la ricerca di anticorpi della Malattia Vescicolare del suino (metodo di prova normato, OIE Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed 2008, cap 2.8.9., par B.2.b; "Swine vesicular disease – Diagnostic techniques - Serological test – Enzyme-linked immunosorbent assay")

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

A ciascun laboratorio sono stati distribuiti 25 campioni codificati con numero progressivo da 1 a 25. Il pannello è composto da:

- 7 campioni corrispondenti a diluizioni scalari in base 2 di un siero positivo sperimentale (codice identificativo N.4 infezione sperimentale del 20/12/93), ottenute in siero negativo, oltre a 3 campioni corrispondenti alla diluizione 1/81, distribuita in tripla aliquota);
- 3 sieri di campo prelevati il 12/05/2007 in focolaio di MVS con infezione in atto, oltre alla diluizione 1/7 in siero negativo di uno di essi, distribuita in tripla aliquota;
- 4 sieri positivi di campo a vario titolo;
- 5 sieri negativi di campo;

La numerazione progressiva dei campioni da 1 a 25 non rispecchia l'ordine delle diluizioni, ma è stata assegnata in modo casuale.

Il dettaglio dei campioni, con i risultati ottenuti dal CERVES in quattro diverse metodiche sierologiche, è riportato nella **tabella 1**. I sieri positivi sono rappresentativi di varie fasi di infezione e presentano pattern anticorpali di varia composizione (IgM, IgG).

Reagenti

Per la prova eseguita nelle condizioni standard routinarie: i reagenti biologici sono quelli utilizzati correntemente dai Laboratori partecipanti, prodotti e distribuiti dal CERVES, IZSLER.

Per la prova eseguita con kit stabilizzato sono stati forniti:

- tre piastre, imbustate singolarmente, preventivamente adsorbite con anticorpo monoclonale di cattura 5B7 ed antigene MVS immuno-complessato;
- anticorpo monoclonale 5B7 marcato con perossidasi stabile a + 4°C, 10X.

Criteri di Interpretazione

Nella presentazione dei risultati, conformemente al protocollo del metodo, un siero è interpretato come positivo se produce una inibizione $\geq 80\%$ alla prima diluizione esaminata (1/7,5), dubbio se l'inibizione è compresa tra 70% e 80%, negativo se l'inibizione è $< 70\%$.

Nella elaborazione conclusiva l'espressione "dubbio" è stata valutata come "positivo", poiché un campione che produce esito dubbio viene sottoposto ad analisi aggiuntive di conferma come i campioni positivi.

Riservatezza

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

I Laboratori sono identificati con un numero.

Riferimenti bibliografici

1. Brocchi E, Berlinzani A, Gamba D, De Simone F. Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. J Virol Methods. - Vol. 52 (1995). – p 155-167.
2. Heckert A, Brocchi E, Berlinzani A, Mackay D. An international comparative analysis of a competitive ELISA for the detection of antibodies to swine vesicular disease virus. J Vet Diagn Invest – Vol 10 (1998) – p 295-297
3. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008, Chapter 2.8.9: Swine Vesicular Disease, 1139-1145
4. Legislazione europea: Commission decision 4 July 2000 (2000/428/EC), establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for the evaluation of results of laboratory tests for the confirmation and differential diagnosis of swine vesicular disease

Tab. 1: Composizione, origine e caratteristiche reattive relative del pannello di sieri

			identificativo SIERO	risultati ELISA competitiva	ELISA IgG	ELISA IgM	titolo SN
Siero Positivo N. 4 Infezione Sperimentale 20/12/93		1/2	23	pos	pos	neg	1/2048
		1/4	21	pos	pos	neg	1/8192
		1/8	6	pos	pos	neg	1/2048
		1/16	16	pos	pos	neg	1/512
		1/32	2	pos	pos	neg	1/512
		1/64	17	dubbio/pos	pos	neg	1/245
		1/81	8,12,18	dubbio/pos	neg	neg	1/256
		1/128	14	neg	neg	neg	neg
Sieri di campo, infezione acuta 12/05/07	Suino 3	Non diluito	7	pos	neg	pos	1/4096
		1/7	4,11,22	pos	neg	pos	1/1024
	Suino 2	Non diluito	13	pos	neg	pos	1/2048
	Suino 1	Non diluito	25	pos	neg	tracce	1/256
Pos. di campo	Non diluito	1	pos	pos	neg	>1/8192	
Pos. di campo	Non diluito	3	pos	pos	neg	1/4096	
Pos. di campo	Non diluito	10	pos	tracce	pos	1/1024	
Pos. di campo	Non diluito	20	pos	pos	neg	1/2048	
Neg. di campo	non diluito	5	neg	neg	neg	neg	
Neg. di campo	non diluito	9	neg	neg	neg	neg	
Neg. di campo	non diluito	15	neg	neg	neg	neg	
Neg. di campo	non diluito	19	neg	neg	neg	16	
Neg. di campo	non diluito	24	neg	neg	neg	neg	

Nota: le prove sierologiche che hanno prodotto i risultati riportati in tabella sono state eseguite presso il CERVES

ANALISI DEI DATI OTTENUTI CON I REAGENTI E LE CONDIZIONI STANDARD

RISULTATI

Valutazione dei controlli della reazione

I criteri di accettabilità della reazione sono impostati su quattro 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 di Referenza*: rappresenta uno standard secondario corrispondente allo Standard Internazionale RS 4, che definisce la concentrazione minima di anticorpi che tutti i Laboratori e test devono riconoscere come positiva. Questo standard, esaminato nelle due diluizioni, 1/7,5, 1/22,5 previste dalla procedura, si comporta come un campione debolmente positivo.
- *Siero Controllo fortemente positivo*: siero sperimentale ad alto titolo, esaminato in quattro diluizioni scalari, da 1/7,5 in base 3 (1/7,5, 1/22,5, 1/67,5, 1/202,5), calibrato in modo da presentare una iniziale riduzione della inibizione in corrispondenza della quarta diluizione.
- *Siero Controllo Negativo*: pool di sieri negativi, esaminato nelle due diluizioni, 1/7,5, 1/22,5.

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 1/7,5; il risultato è

Positivo: quando la % inibizione è ≥ 80

Dubbio: quando la % inibizione è compresa tra 70 e 80

Negativo: quando la % inibizione è < 70

Controllo Antigene

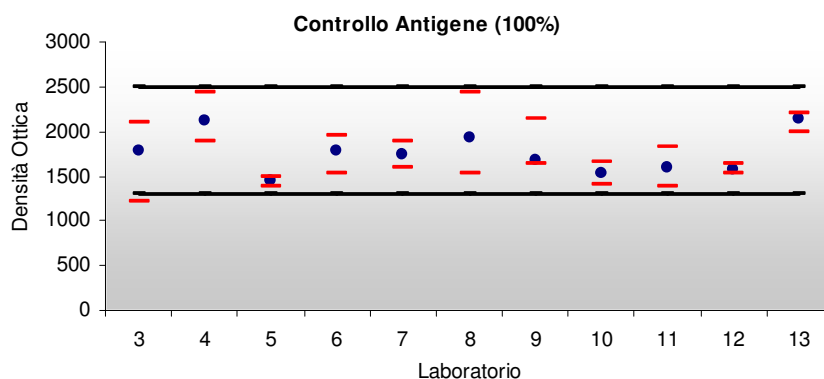
I limiti di accettabilità per la Densità Ottica rilevata nella reazione di controllo 100% (assenza totale di inibizione) corrispondono al range $1,9 \pm 0,6$ unità (espressi anche nella modalità 1900 ± 600).

In fig.1 sono riportati i valori ottenuti dagli 11 Laboratori partecipanti, espressi come valori minimo, massimo e medio di 12 repliche, corrispondenti ai 4 pozzetti della reazione di controllo in tre piastre ELISA indipendenti.

Tutti i valori rientrano nei limiti previsti, con una sola eccezione per il valore minimo osservato in una delle tre prove dal Laboratorio 3, appena sotto la soglia inferiore (DO 1,278).

In nove Laboratori l'escursione dei valori nelle tre prove è contenuta, mentre nei Laboratori 3 e 8 la variabilità si estende in tutto il range indicato dalla procedura.

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

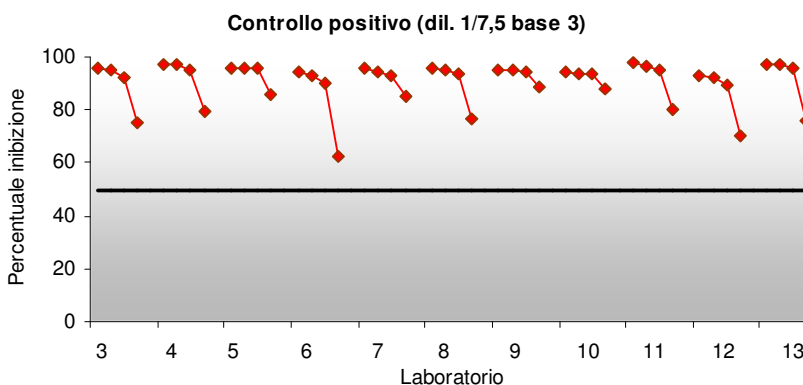


Siero controllo fortemente positivo

Il Metodo di Prova prevede l'esame di quattro diluizioni (da 1/7,5 in base 3) del Controllo fortemente positivo; la diluizione più elevata deve generare una inibizione $\geq 50\%$.

Le curve dose-risposta osservate negli 11 laboratori sono sovrapponibili (figura 2). In tutti i laboratori i risultati sono conformi all'atteso. Le concentrazioni anticorpali più elevate (prime tre diluizioni) producono percentuali di inibizione nel livello di massimo plateau, mentre la quarta diluizione segnala una iniziale diminuzione della inibizione, correlata alla riduzione della concentrazione di anticorpi.

Figura 2. Percentuali di inibizione del Siero di Controllo fortemente positivo alle quattro diluizioni esaminate (valori medi di tre prove)



Siero di Referenza

Il Metodo di Prova prevede l'esame di due diluizioni (1/7,5, 1/22,5) del Siero di Referenza debole positivo, con un risultato atteso di inibizione $\geq 70\%$ alla prima diluizione.

In fig. 3 sono riportati i valori medi di inibizione (ottenuti nelle prove) prodotti dal Siero di Referenza alle due diluizioni in esame.

In fig. 4 è riportato, oltre al valore medio, il dettaglio del rispettivo valore minimo e massimo osservato alla prima diluizione (1/7,5) del Siero di Referenza.

La percentuale di inibizione prodotta dal Siero di Referenza alla prima diluizione (1/7,5) è risultata conforme all'atteso ($\geq 70\%$) in otto Laboratori, mentre non ha raggiunto il valore minimo atteso in tre Laboratori, in particolare:

- il Laboratorio n. 6 ha ottenuto inibizioni lievemente inferiori alla soglia in due prove su tre (inibizione media 69%),
- il Laboratorio n. 8 ha ottenuto valori inferiori alla soglia nelle tre prove (inibizione media 57%),
- il Laboratorio n. 9 ha ottenuto valori inferiori alla soglia in due prove su tre (inibizione media 62%), con le maggiori oscillazioni tra prove.

Escludendo il Laboratorio n. 9, l'oscillazione del valore % di inibizione tra le varie prove intra-laboratorio è risultata minima (CV intra-laboratorio medio = 3, con minimo 1 e massimo 8, indicando una buona ripetibilità).

Il CV calcolato tra Laboratori corrisponde al valore 15, ma limitatamente agli otto Laboratori che hanno riconosciuto correttamente il Siero di Referenza il valore del CV è risultato 6, indicando una riproducibilità elevata.

I dati confermano che questo siero è calibrato per rappresentare la concentrazione minima di anticorpi che i Laboratori che effettuano la prova devono rilevare. Il siero reagisce come un campione debolmente positivo, distinguibile da un siero ad elevata concentrazione anticorpale; infatti, mentre il controllo fortemente positivo produce una percentuale di inibizione intorno a 95% in tutti i Laboratori, il siero di referenza debolmente positivo si attesta intorno all'80% nella maggioranza dei Laboratori.

Figura 3: Media delle percentuali di inibizione del Siero di Referenza (dil. 1/7,5, 1/22,5) ottenute dai laboratori in tre prove indipendenti

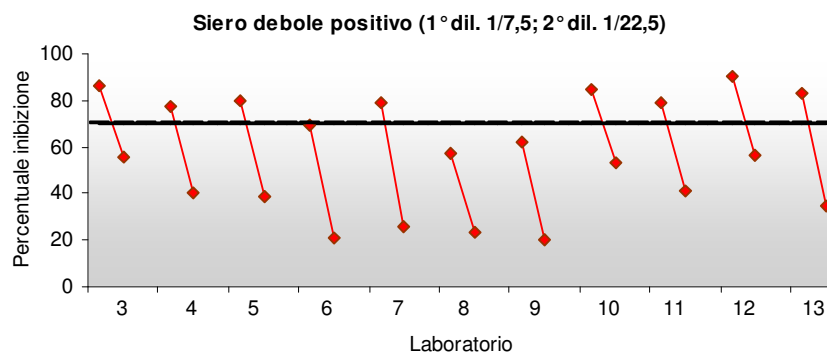
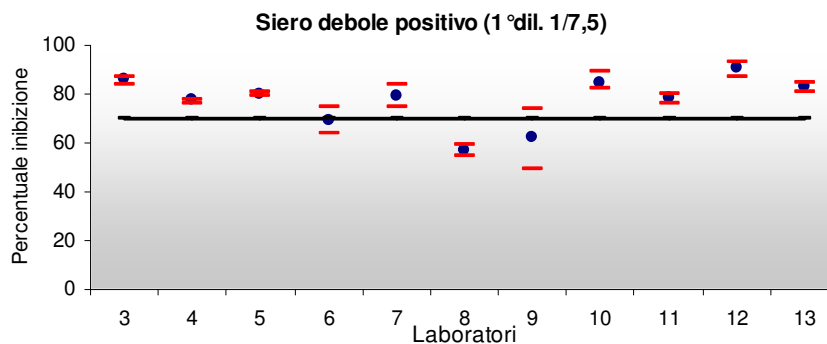


Figura 4: Valori medi, minimi e massimi (derivati da tre prove) delle percentuali di inibizione ottenute dai laboratori alla prima diluizione (1/7,5) del Siero di Referenza

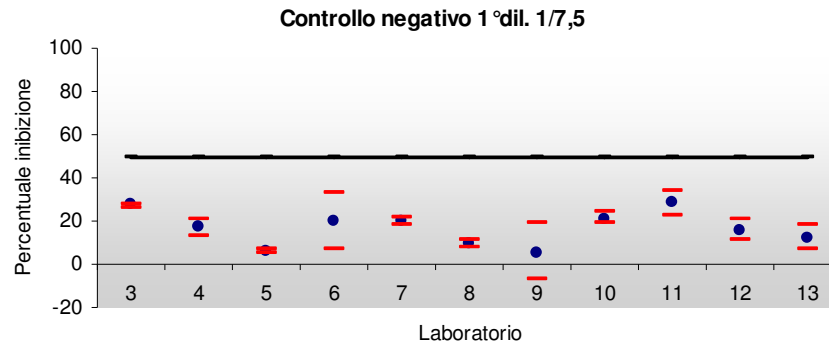


Siero di controllo negativo

In figura 5 sono riportati i valori medi, con rispettivi valori minimi e massimi, osservati alla prima diluizione (1/7,5) 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 1/7,5) in tutti i laboratori.

Figure 5. Media, valori minimi e massimi delle percentuali di inibizione del Siero di Controllo negativo (prima dil. 1/7,5) osservati dai laboratori (derivati da tre prove)



Valutazione dei risultati forniti dagli 11 Laboratori per i 25 sieri in esame

In tabella 2 sono riportati i risultati dettagliati per ciascuna delle tre repliche (P1, P2, P3= piastra 1,2,3) ottenuti dai laboratori.

I campioni, codificati da 1 a 25, sono stati riordinati sulla base della rispettiva origine, tipologia di reattività e scalarità delle diluizioni.

			Lab 3			Lab 4			Lab 5			Lab 6			Lab 7			Lab 8			Lab 9			Lab 10			Lab 11			Lab 12			Lab 13				
Sieri		Esito atteso	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3		
Siero positivo N4 infezione sper. 20/12/93	1/2	23	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/4	21	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/8	6	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/16	16	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/32	2	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	P	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/64	17	Positivo	DB	DB	DB	DB	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	N	N	DB	DB	DB	DB	DB	N	N	N	DB	DB	DB	DB	P	P	DB	N	DB	N	DB	DB	
	1/128	14	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1/81	8	Positivo	DB	DB	DB	DB	DB	DB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	DB	DB	DB	DB	DB	DB	N	N	DB	N	DB	DB	
	12	Positivo	N	N	N	DB	DB	DB	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	DB	P	N	N	N	DB	DB	DB	DB	DB	DB	N	DB	N	N	N	P		
	18	Positivo	N	N	N	DB	DB	DB	N	N	N	DB	N	N	N	DB	N	DB	DB	DB	N	N	N	DB	DB	P	DB	DB	DB	N	N	N	N	N	DB		
Siero positivo di campo infez. acuta 12/05/2007	Suino 3	1/1	7	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P
			4	Positivo	P	P	P	DB	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	P	P
		1/7	11	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	P	P	P	DB	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
			22	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	DB	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Suino 2	1/1	13	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	P	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Suino 1	1/1	25	Positivo	DB	DB	DB	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	DB	DB	N	N	N	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	P	DB	
Sieri positivi di campo	1/1	1	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/1	3	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/1	10	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DB	P	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
	1/1	20	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Sieri negativi di campo	1/1	5	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1/1	9	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1/1	15	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1/1	19	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	1/1	24	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	

Legenda: P= Positivo; DB= Dubbio; N=Negativo

Tabella 2: Dettaglio dei risultati ottenuti nell'esame dei campioni del ring test per MVS dagli 11 Laboratori partecipanti (reagenti standard, non stabilizzati)

Nell'analisi del pannello di 25 sieri i Laboratori hanno ottenuto risultati coerenti con la concentrazione anticorpale nei campioni esaminati, riconoscendo come debolmente positivi o dubbi i campioni corrispondenti a diluizioni vicine al limite di rilevabilità.

Con riferimento alle diluizioni seriali in base 2 ($1/2 \rightarrow 1/128$) del siero positivo da infezione sperimentale, la diluizione più elevata, 1/128 corrispondente al campione n.14, è risultata negativa in tutti i Laboratori, mentre la diluizione precedente, 1/64 corrispondente al campione n.17, è coincisa con la concentrazione minima rilevabile in tutti i Laboratori, che hanno riportato per questo campione risultati positivi e/o dubbi (P/DB), con variabilità anche intra-laboratorio tra le prove.

I campioni n. 8, 12, 18 corrispondono alla diluizione intermedia 1/81, distribuita in tre aliquote identiche: i risultati per questi campioni sono coerenti con la condizione di cut-off ed evidenziano i Laboratori con la migliore performance di sensibilità analitica.

Solo il Laboratorio 9 ha identificato il campione 17 come negativo in tutte le tre repliche e come dubbi i campioni corrispondenti a due precedenti diluizioni, confermando una sensibilità inferiore nella performance del test, osservata anche con il Siero di Referenza debolmente positivo.

Anche nel Laboratorio 8 ed in minor misura nel Laboratorio 6, lo Standard debolmente positivo, non aveva raggiunto la soglia di accettabilità; mentre nel laboratorio 6 i risultati dei campioni con le concentrazioni anticorpali minori rispecchiano una sensibilità lievemente inferiore ad altri Laboratori, con alcuni esiti dubbi e una prova negativa per il campione 17, i risultati ottenuti dal Laboratorio 8 sono sovrapponibili a quelli della maggior parte dei Laboratori, suggerendo l'ipotesi di una possibile degradazione del Siero di Referenza debolmente positivo.

I sieri con anticorpi di classe IgM (7, 4-11-22, 13, 25), prelevati da animali con malattia in fase acuta, sono stati correttamente identificati da tutti i laboratori, tranne il campione n. 25 che non è stato riconosciuto positivo dal Laboratorio 9 in nessuna delle tre repliche.

E' rimarchevole il rilievo che i campioni identici 4, 11 e 22, costruiti come diluizione del campione n.7 per mimare sieri debolmente positivi, sono stati coerentemente e ripetutamente riconosciuti positivi da tutti i Laboratori. Il maggior numero di esiti dubbi per questi campioni è stato osservato nei Laboratori 6 e 9.

La concordanza dei risultati tra laboratori è massima nel caso dei sieri a più elevata concentrazione anticorpale e dei sieri negativi.

I risultati difformi rispetto al test di sieroneutralizzazione, o discordanti tra laboratori, sono osservati solo per i campioni che si riferiscono alle diluizioni più vicine al limite di rilevabilità, quindi più soggette a variabilità intra- ed inter-laboratorio.

CONCLUSIONE

I risultati di questo ring test confermano che la performance dei laboratori IZZSS nell'esecuzione del test sierologico ELISA competitiva per lo screening degli anticorpi anti-MVS è complessivamente soddisfacente.

I parametri di controllo della reazione sono stati conformi ai requisiti di accettabilità del Metodo di Prova, con la sola debolezza a carico del Siero di Referenza (debolmente positivo), che è risultato molto vicino al valore limite nel Laboratorio 6 (69%) ed inferiore al limite di accettabilità nei Laboratori 8 e 9, ma per cause probabilmente diverse. Il Siero di Referenza costituisce un importante parametro di calibrazione della reazione, rappresentando la concentrazione minima di anticorpi che dovrebbe produrre una risposta positiva in tutte le prove; i campioni al limite della positività possono essere soggetti ad una maggiore variabilità intra- ed inter-laboratori, sia in caso di possibile decadimento-degradazione degli anticorpi presenti in concentrazione minima (probabile causa della ridotta performance nel Laboratorio 8), sia per l'interferenza di altri parametri chimico-

fisici della reazione, direttamente gestiti dai laboratori (soluzioni tampone, additivi biologici, reattivi chimici, condizioni fisiche quali temperatura, umidità, tempo ecc).

La valutazione dei risultati riportati dagli 11 laboratori per il pannello dei 25 sieri codificati ha dimostrato che il test è utilizzato correttamente e fornisce risultati riproducibili, coerenti con la concentrazione anticorpale nel campione in esame.

Un solo campione positivo (n. 25) non è stato rilevato correttamente da un unico Laboratorio (Laboratorio 9), che ha presentato anche altre evidenze di una sensibilità inferiore rispetto al complesso degli altri Laboratori.

Nonostante il metodo sia un test in-house, che diversamente dai kit stabilizzati pronto-uso è soggetto a molteplici sorgenti di variabilità tra laboratori, l'uniformità dei risultati e la corretta identificazione dei campioni hanno dimostrato che il test è caratterizzato dalla robustezza necessaria per fornire risultati riproducibili quando utilizzato in laboratori e da operatori diversi. Gli standard operativi degli 11 laboratori partecipanti al Ring Test e coinvolti nell'esame delle prove di screening per il Piano Nazionale di sorveglianza/eradicazione della MVS sono adeguati.

ANALISI DEI DATI OTTENUTI CON KIT STABILIZZATO

PREMESSA

Come anticipato in introduzione un nuovo obiettivo del ring test 2007-2008 è stata la valutazione dei risultati, generati sullo stesso pannello di sieri, con la prova ELISA per la sierologia MVS eseguita utilizzando il kit stabilizzato prodotto dall'IZSLER.

L'IZSLER ha sviluppato la tecnologia per trasformare in kit pronto-uso alcuni test ELISA home-made, al fine di rendere più robusti i test, riducendo le fonti di variabilità, e semplificarne l'esecuzione, fornendo piastre già sensibilizzate e predisposte per la distribuzione dei campioni.

Hanno partecipato alla prova inter-laboratorio 10 IZZSS, oltre al Laboratorio diagnostico del CERVES e a due Sezioni Diagnostiche dell'IZSLER che sono state attivate all'effettuazione della prova durante l'emergenza diagnostica occorsa nel 2007 (oltre 500.000 esami in Lombardia), per un totale di 13 Laboratori.

Per la prova da eseguire con kit stabilizzato sono stati forniti:

- tre piastre ELISA, imbustate singolarmente sottovuoto, preventivamente adsorbite con anticorpo monoclonale di cattura 5B7 ed antigene MVS immuno-complessato, sottoposte a processo di stabilizzazione e conservabili a +4°C;
- anticorpo monoclonale 5B7 marcato con perossidasi stabile a +4°C, 10X.

Le soluzioni di lavaggio, di diluizione per sieri e marcato, di sviluppo e di blocco della reazione cromogena sono le stesse della prova eseguita abitualmente e quindi sono state preparate dai singoli Laboratori.

RISULTATI

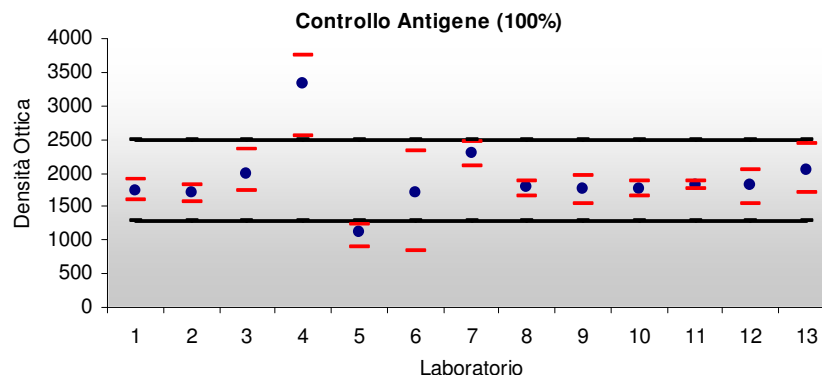
L'elaborazione e la presentazione dei risultati ottenuti con il kit stabilizzato ricalcano il modello utilizzato per le prove eseguite con reagenti standard.

Valutazione dei controlli della reazione

Controllo Antigene

I valori medi del controllo antigene sono risultati conformi in 11 su 13 Laboratori; un Laboratorio ha ottenuto valori significativamente superiori e un altro lievemente inferiori ai limiti di accettabilità (figura 1). Solo in due Laboratori l'escursione tra prove è stata elevata.

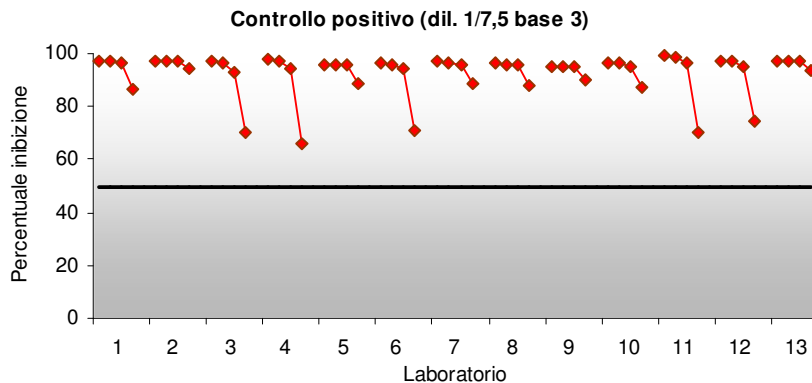
Figura 1. Valori medio, minimo e massimo del Controllo Antigene (100%), ottenuti con kit stabilizzato, ricavati da 3 reazioni indipendenti (4 repliche/piastra X 3 piastre) per ciascun laboratorio



Siero controllo fortemente positivo

Tutti i risultati sono conformi e sovrapponibili a quelli ottenuti con reagenti standard (figura 2).

Figura 2. Percentuali di inibizione del Siero di Controllo fortemente positivo alle quattro diluizioni esaminate (valori medi di tre prove, kit stabilizzato)



Siero di Referenza

La percentuale di inibizione prodotta dal Siero di Referenza alla prima diluizione (1/7,5) è conforme ($\geq 70\%$) in 10 Laboratori e molto vicina alla soglia (limite inferiore) in tre Laboratori (figure 3-4). Tra questi il Laboratorio 6 ha ottenuto un risultato simile per il Siero di referenza anche utilizzando i reagenti standard non stabilizzati, sia in questo che nel precedente ring test, suggerendo che tale tendenza possa essere dovuta non ai reagenti primari della reazione (anticorpo di cattura, anticorpo coniugato e antigene) ma a tamponi preparati localmente. Nel Laboratorio 12 l'elevata escursione tra prove ha inciso nella determinazione di un valore medio lievemente inferiore a quello conforme. Nel Laboratorio 4 i valori borderline (66%,65%,64%) osservati in tutte le tre sessioni di prova sono concomitanti con valori molto elevati ($\gg 3$ OD) del Controllo antigene: la competizione di campioni debolmente positivi potrebbe essere mascherata dall'eccesso della reazione di controllo.

Escludendo il Laboratorio n. 12, l'oscillazione del valore % di inibizione tra le varie prove intra-laboratorio è risultata minima (CV intra-laboratorio medio = 6, con minimo 1 e massimo 9, indicando una buona ripetibilità).

Il CV calcolato tra tutti i 13 laboratori è 12, quindi migliorato rispetto a quello ottenuto osservato utilizzando i reagenti in forma non stabilizzata ed indice di buona riproducibilità.

Figura 3: Media delle percentuali di inibizione del Siero di Referenza (dil. 1/7,5, 1/22,5) ottenute dai laboratori in tre prove indipendenti con il kit stabilizzato

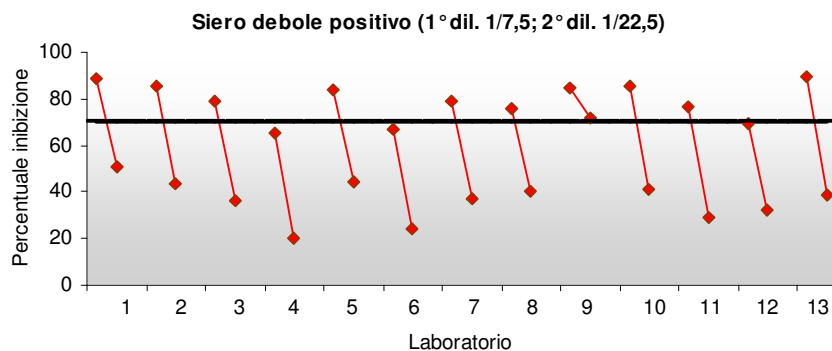
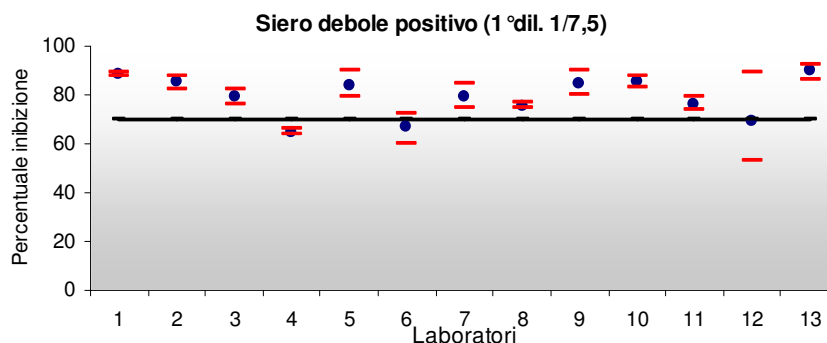


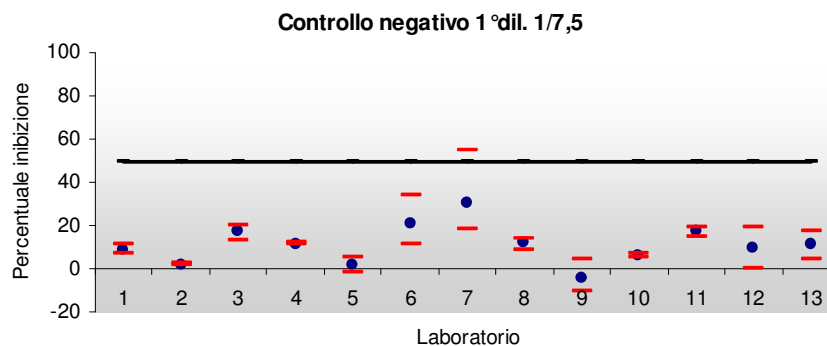
Figura 4: Valori medi, minimi e massimi (derivati da tre prove con kit stabilizzato) delle percentuali di inibizione ottenute dai laboratori alla prima diluizione (1/7,5) del Siero di Referenza



Siero controllo negativo

Le percentuali di inibizione prodotte dal Siero Negativo sono conformi in tutti i laboratori. E' stata riscontrata una sola prova non valida in un Laboratorio (n. 7); con esclusione di questa prova la variabilità intra- e tra-laboratori è stata minima (figura 5).

Figure 5. Media, valori minimi e massimi delle percentuali di inibizione del Siero di Controllo negativo (prima dil. 1/7,5) osservati dai laboratori (derivati da tre prove con kit stabilizzato)



Valutazione dei risultati forniti dagli 11 Laboratori per i 25 sieri in esame

In tabella 4 sono riportati i risultati dettagliati per ciascuna delle tre repliche (P1, P2, P3 = piastra 1, 2, 3) ottenuti dai laboratori utilizzando il kit stabilizzato.

Tutti i laboratori hanno ottenuto risultati coerenti con gli esiti attesi.

La sensibilità analitica è lievemente migliorata rispetto all'utilizzo dei reagenti standard non stabilizzati, poiché i campioni n. 8, 12, 17, corrispondenti a tre aliquote identiche della diluizione limite 1/81 di un siero positivo sperimentale, sono stati riconosciuti da tutti i Laboratori come dubbi o positivi, senza nessun esito negativo, come invece era stato osservato in una considerevole proporzione delle prove effettuate con kit non stabilizzato.

In particolare il Laboratorio N. 9, che presentava la minor performance rispetto alla sensibilità con l'utilizzo dei reagenti standard, ha maggiormente beneficiato dell'uso del kit stabilizzato, identificando correttamente come positivo anche il campione n. 25, classificato erroneamente come negativo nelle prove eseguite con i reagenti standard non stabilizzati.

			Lab 1			Lab 2			Lab 3			Lab 4			Lab 5			Lab 6			Lab 7			Lab 8			Lab 9			Lab 10			Lab 11			Lab 12			Lab 13			
Sieri		Esito atteso	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
Siero positivo infezione sper.N4 del 20/12/93	1/2	23	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	1/4	21	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	1/8	6	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	1/16	16	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	1/32	2	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	1/64	17	Positivo	DB	DB	P	P	DB	P	N	N	N	DB	DB	N	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	N	N	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	P	P	N	DB	N	DB	DB	P
	1/128	14	Positivo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1/81	8	Positivo	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	P	P	DB	DB	DB	DB	P	DB	DB	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	DB	DB	DB	DB	P	P	P
	12	Positivo	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	P	P	P	
	18	Positivo	P	DB	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	P	DB	P	P	P	P	DB	DB	P	P	DB	DB	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	P	DB	DB	P	DB	P	P	P	
Siero positivo di campo in fase acuta 12/05/2007	Suino 3	tq	7	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
			4	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		1/7	11	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
		22	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Suino 2	tq	13	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		
Suino 1	tq	25	Positivo	P	P	P	P	P	P	DB	DB	DB	P	DB	P	P	P	P	DB	DB	DB	DB	P	DB	P	P	P	DB	DB	DB	DB	P	P	DB	DB	DB	P	P	P			
sieri positivi di campo	tq	1	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			
	tq	3	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			
	tq	10	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			
	tq	20	Positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			
Sieri negativi di campo	tq	5	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
	tq	9	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
	tq	15	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
	tq	19	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
	tq	24	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			

Legenda: P= Positivo; DB= Dubbio; N=Negativo

Tabella 4: Dettaglio dei risultati ottenuti nell'esame dei campioni del ring test per MVS utilizzando il kit stabilizzato. Laboratori partecipanti = 13

Confronto risultati ottenuti con reagenti routine e kit pronto uso

La tabella 5 confronta per ciascun siero i risultati ottenuti con i reagenti standard e con il kit stabilizzato, esponendo le percentuali degli esiti positivi, dubbi o negativi (P, DB, N) calcolate sull'insieme delle prove eseguite in 11 Laboratori.

E' evidente uno shift di risultati da dubbi a positivi e da negativi a dubbi, in corrispondenza dei campioni a più bassa concentrazione anticorpale.

Tabella 5. .Confronto tra risultati ottenuti con kit MVS non stabilizzato e stabilizzato

			KIT reagenti standard			Kit stabilizzato				
			Sieri	% P	% DB	% N	%P	%DB	%N	
Siero positivo N4 infezione sperimentale 20/12/93			1/2	23	100			100		
			1/4	21	100			100		
			1/8	6	100			100		
			1/16	16	91	9	100			
			1/32	2	88	12	100			
			1/64	17	12	67	21	21	55	24
			1/128	14	100			100		
			1/81	8	10	45	45	42	58	
12	9	33		58	36	64				
18	3	55		42	55	45				
Siero positivo di campo infez. acuta 12/05/2007	Suino 3	1/1	7	97	3	100				
		1/7	4	76	24	100				
			11	76	24	100				
			22	76	24	100				
	Suino 2	1/1	13	88	12	100				
Suino 1	1/1	25	33	58	9	52	48			
sieri positivi di campo			1/1	1	100			100		
			1/1	3	100			100		
			1/1	10	88	12	100			
			1/1	20	100			100		
Sieri negativi di campo			1/1	5	100			100		
			1/1	9	100			100		
			1/1	15	100			100		
			1/1	19	100			100		
			1/1	24	100			100		

La tabella successiva riporta il dettaglio dei kit distribuiti nel corso del **triennio 2006-2008**, su specifica richiesta, agli Istituti Zooprofilattici incaricati dell'esecuzione del test di screening per gli anticorpi anti-MVS nell'ambito del Piano Nazionale; la tabella riporta anche il numero di sieri esaminati, estratti dai record trasmessi dagli IIZZSS stessi. Lo scopo della presentazione di questi dati è quello di evidenziare la percentuale di utilizzo dei reagenti nei laboratori.

	Anno 2006			Anno 2007			Anno 2008		
	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.	Campioni esaminati documentati	Numero determ. fornite	% utiliz.
IZS PLV, TORINO	11812	25000	47	11384	5000	>100*	28292	25000	>100*
IZS VE, PADOVA	43110	30000	>100*	18495	10000	>100*	35434	43000	82
IZS LT, ROMA	6244	10000	62	9059	30000	30	29434	25000	>100*
IZS UM, PERUGIA	6229	15000	41	4547	15000	30	77070	36000	>100*
IZS AM, TERAMO	21128	42000	50	23800	30000	80	30608	40000	76
IZS PB, FOGGIA	6130	11000	56	4278	6000	71	20084	21000	95
IZS ME, NAPOLI	31568	70000	45	24522	40000	61	60194	30000	>100*
IZS CATANZARO	16102	26000	62	9978	18000	55	19016	24000	79
IZS SI, PALERMO	9876	20000	49	5867	20000	29	8910	15000	59
IZS SA, SASSARI	4197	30000	14	903	20000	4.5	36091	30000	>100*
IZSLER, BRESCIA	172.834	non appl	non a.	548.136	non appl	non a.	271.433	non appl	non a.
Totale	329.230	279.000		660.969	194.000		616566	289.000	

* Campioni esaminati ad una sola diluizione (1/7,5) e/o utilizzo di kit in giacenza dell'anno precedente

Complessivamente, il CERVES ha **distribuito nel 2007 kit per 194.000 analisi a 10 IIZZSS**. A questi sono da aggiungere quelli utilizzati presso il CERVES sia per l'attività di sorveglianza nelle due regioni territorialmente competenti (Lombardia-Emilia Romagna), sia per i test ELISA di conferma, corrispondenti a **548.136 test ELISA**, per una produzione totale di quasi **700.000 test**. Il picco di produzione e attività registrato nel 2007 è il riflesso dell'incremento di controlli sierologici attivati in seguito all'accertamento di focolai di malattia in Lombardia, alla relativa eradicazione ed alle successive attività straordinarie di siosorveglianza.

Nel corso del **2008**, il CERVES ha **distribuito kit per l'analisi di 289.000 campioni a 10 IIZZSS, circa il 50% in più rispetto all'anno precedente**, sia in considerazione dell'attivazione del nuovo Piano di sorveglianza nazionale implementato nel 2008, che ha comportato una intensificazione dei controlli, sia conseguentemente alle azioni straordinarie in province nelle quali è stato sospeso l'accreditamento. Aggiungendo quelli utilizzati presso il CERVES, corrispondenti a **271.433 test ELISA**, si è registrata una produzione totale di oltre **600.000 test**.

E' positivo il rilievo di una percentuale di utilizzo del materiale fornito ai vari IIZZSS molto migliorata rispetto al 2007; questo è indice di un uso più accorto o più corretto, può essere correlato al consumo di scorte in giacenza da anni precedenti e, per alcune realtà (in genere coincidenti con emergenze diagnostiche), anche alla riduzione delle diluizioni esaminate dei sieri da due ad una.