



**CIRCUITO INTERLABORATORIO
PER LA RICERCA DI ANTICORPI
NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELLA
LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA**

EDIZIONE 2024

REPORT FINALE

**Centro di Referenza Nazionale
per lo studio dei Retrovirus correlati
alle patologie infettive dei Ruminanti
(CEREL)**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati"
via Gaetano Salvemini, 1 - 06126 Perugia

SOMMARIO

INTRODUZIONE	3
DESCRIZIONE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO	3
TIPOLOGIA DEI PANNELLI E LORO COMPOSIZIONE	3
<i>Pannello siero</i>	3
<i>Pannello latte</i>	4
INVIO E ISTRUZIONI PER LA PREPARAZIONE E UTILIZZO DEI CAMPIONI PROVA	5
LABORATORI PARTECIPANTI	5
RISULTATI	7
ESPRESSIONE DEI RISULTATI	7
ELABORAZIONE DEI RISULTATI	7
VARIABILITÀ DEI RISULTATI INTRA-LABORATORIO; RIPETIBILITÀ	7
<i>Variabilità dei risultati inter-laboratorio: riproducibilità</i>	8
<i>Variabilità relativa</i>	8
<i>Accuratezza diagnostica</i>	8
RISULTATI OTTENUTI PER LA RICERCA DI ANTICORPI SUL PANNELLO SIERO MEDIANTE ELISA	9
RISULTATI OTTENUTI PER LA RICERCA DI ANTICORPI SUL PANNELLO LATTE MEDIANTE ELISA	11
RISULTATI DELLE ANALISI STATISTICHE	12
RIPETIBILITÀ E RIPRODUCIBILITÀ	12
<i>Ripetibilità e riproducibilità sul pannello siero mediante ELISA</i>	12
<i>Ripetibilità e riproducibilità sul pannello latte mediante ELISA</i>	13
ACCURATEZZA DIAGNOSTICA	14
ACCURATEZZA ELISA SUL PANNELLO SIERO	14
ACCURATEZZA ELISA SUL PANNELLO LATTE	14
CONCLUSIONI	15

Introduzione

Il CEREL organizza con frequenza biennale il circuito interlaboratorio per la diagnosi sierologica di Leucosi Bovina Enzoootica (LEB), con l'obiettivo principale di contribuire alla standardizzazione delle procedure diagnostiche impiegate per le analisi ufficiali eseguite dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (II.ZZ.SS.) e previste dalla normativa per la sorveglianza o l'eradicazione di questa malattia infettiva.

Dal 2017 l'Italia è stata riconosciuta ufficialmente indenne da LEB, nonostante la persistenza di alcuni clusters di infezione nelle regioni Campania, Puglia e Lazio. Nel 2021, inoltre, la legislazione dell'Unione Europea in materia di Sanità Animale è stata aggiornata con l'adozione del Regolamento UE 2016/429 (AHL), e conseguenti regolamenti delegati e di esecuzione della Commissione Europea. Il lavoro di adeguamento della normativa nazionale, avviato dal Ministero della Salute in collaborazione con il CEREL, è stato portato a termine recentemente, con la pubblicazione, a Giugno 2024, di un nuovo documento di orientamento che aggiorna le precedenti linee guida per la sorveglianza della LEB a seguito del superamento dei 5 anni dall'ottenimento dello status di indenne (nota 0020594-28/06/2024-DGSAF-MDS-P: "Leucosi Bovina Enzoootica (LEB): orientamenti sulle misure di sorveglianza sul territorio nazionale per il periodo 2024-2030"). Gli orientamenti contengono tutti gli aspetti relativi alla esecuzione dei controlli ufficiali ai fini della sorveglianza, per consentire il mantenimento dello status di indennità acquisito ai sensi del Regolamento (UE) 2020/689 (modalità e tempistiche); alla gestione dei cluster di infezione per LEB; alle movimentazioni di bovini; alle misure da attuare in caso di positività, comprese le procedure di pulizia e disinfezione degli stabilimenti; ai flussi informativi e alla redazione delle schede epidemiologiche. Gli orientamenti contengono anche le indicazioni relative alle prove diagnostiche ufficiali per LEB (obiettivo e campo di applicazione). A fronte della definizione di caso sospetto e caso confermato e della indicazione dei test diagnostici da effettuarsi nell'ambito dei controlli ufficiali (Regolamento (UE) 2020/689), è stato disposto che i laboratori ufficiali locali presso gli II.ZZ.SS. competenti per territorio eseguano la diagnosi indiretta mediante test ELISA.

I laboratori devono pertanto mantenere in uso le prove diagnostiche per LEB e inserirle nel sistema di accreditamento che certifica l'adeguatezza e la standardizzazione delle prove stesse. È quindi strategicamente importante che i test diagnostici in questo campo siano condotti secondo gli standard indicati dalle norme ISO/IEC17025, affinché i risultati espressi possano essere accettabili in ambito nazionale, comunitario e internazionale. Secondo la norma ISO/IEC17025, i circuiti interlaboratorio possono essere utilizzati per documentare la riferibilità delle misure, validare i metodi di prova e valutare la competenza tecnica dei laboratori. Infine, la composizione dei pannelli dei campioni e lo schema delle prove sono stati determinati sulla base del Decreto Ministeriale (D.M.) 2 maggio 1996 n. 358 e del Decreto Legislativo (D. Lgs.) 22 maggio 1999 n. 196 che, sebbene abrogati ma non sostituiti, rappresentano tuttora il riferimento relativamente ai dettagli tecnici per le prove diagnostiche.

Descrizione del circuito interlaboratorio

Tipologia dei pannelli e loro composizione

Il circuito interlaboratorio per la ricerca di anticorpi nei confronti del Virus della LEB si compone di due pannelli: Pannello per la ricerca di anticorpi nel siero ("Pannello siero") e Pannello per la ricerca di anticorpi nel latte ("Pannello latte").

Pannello siero

Sono stati selezionati in totale 10 campioni di siero che il CEREL ha provveduto a stoccare in idonee quantità e ad identificare mediante numerazione progressiva. La composizione del "pannello siero" è schematizzata nella tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche del pannello siero.

Id campione	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10
Atteso	N	P	P	N	P	P	N	P	N	N
Composizione campione	A2	SS	SS	A1	SS	SS	A2	SS	A1	A2
Diluzione	-	1/75	1/50	-	1/25	1/10	-	1/100	-	-

S: siero

P: positivo

N: negativo

SS: Sub-standard

A1-A2: sieri negativi di campo

I sieri negativi appartenevano a 2 diversi soggetti risultati negativi per anticorpi specifici nei confronti del virus della LEB sia al test AGID sia al test ELISA, scelti all'interno di allevamenti ufficialmente indenni da LEB da oltre cinque anni; di questi campioni è stata verificata l'assenza di reazioni aspecifiche in test immunoenzimatici per la diagnosi indiretta di virus della LEB; nei test di immunodiffusione non sono comparse linee di precipitazione.

I sieri positivi per LEB sono stati ottenuti dal sub-standard italiano del siero di riferimento internazionale E5 attraverso diluizioni in siero bovino negativo. Il campione S06 corrisponde alla diluizione 1/10 del siero E5; questa diluizione è stata considerata come la minima accettabile ai fini della valutazione della sensibilità; le diluizioni superiori del siero standard sono state inserite nel pannello per la definizione della sensibilità analitica del laboratorio e per verificare la adeguatezza dei test ELISA nel saggiare pool di sieri.

L'interpretazione dei risultati è stata attesa in senso qualitativo ovvero i laboratori dovevano distinguere i campioni positivi da quelli negativi. È stata comunque ammessa anche l'espressione di risultato dubbio. In conseguenza delle caratteristiche tecniche su cui si basa la prova ELISA e sulla base dei sieri che componevano il pannello distribuito, sono stati considerati conformi all'atteso i risultati espressi come dubbi dei soli campioni positivi. Ai fini del calcolo della ripetibilità e riproducibilità del metodo, i campioni esaminati mediante test ELISA sono stati esaminati in sei ripetizioni.

I campioni S03 e S08 sono stati inseriti nel pannello per valutare la sensibilità analitica della prova ELISA e più in particolare per valutare l'uso di pool di sieri: il campione S03 deve essere infatti visto come positivo per utilizzare pool composti dalla miscelazione di 5 sieri mentre il campione S08 deve risultare positivo per utilizzare pool ottenuti dalla miscelazione di 10 sieri.

Pannello latte

Sono state distribuite in totale 10 campioni di latte contrassegnate da differenti codici. La composizione del pannello di campioni latte è schematizzata nella tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche del pannello latte.

Id campione	L01	L02	L03	L04	L05	L06	L07	L08	L09	L10
Atteso	P	N	N	P	P	P	N	N	P	N
Composizione campione	SS	N	N	SS	SS	SS	N	N	SS	N
Diluzione	1/12.500	-	-	1/18.750	1/2.500	1/25.000	-	-	1/250	-

L: latte

P: positivo

N: negativo

SS: standard

I campioni negativi sono composti da latte di massa proveniente dalla regione Umbria, indenne per LEB da oltre cinque anni.

I campioni positivi numero L01, L04, L05, L06, L09 sono stati ottenuti diluendo il siero sub-standard italiano del siero E5 in latte di massa di un allevamento ufficialmente indenne. La composizione del campione L09 corrisponde alla diluizione 1/250 del siero E5: questo valore rappresenta il requisito minimo previsto nell'allegato tecnico del D.M. 2 maggio 1996 n. 358 per i campioni di latte analizzati in singolo; i campioni L01, L04, L05, L06 sono ulteriori diluizioni del siero standard utili a verificare la capacità di analizzare latte di massa a cui afferiscono diverse bovine.

Per ogni campione di latte è stato chiesto di effettuare sei ripetizioni per valutare la ripetibilità intralaboratorio.

Come previsto da alcuni protocolli per la prova ELISA, è stata ammessa anche l'espressione di risultato dubbio.

Invio e istruzioni per la preparazione e utilizzo dei campioni prova

Le istruzioni fornite in merito alla preparazione dei campioni prevedevano di risospendere i campioni di siero in 1 ml di acqua distillata sterile da analizzare in sei repliche e i campioni di latte in 2 ml di acqua distillata sterile da analizzare in sei repliche, utilizzando una siringa monouso per ciascuna provetta prima dell'esecuzione della prova.

Il partecipante era tenuto ad utilizzare una metodica ELISA a scelta.

Periodo per l'esecuzione delle prove: dal 02/12/2024 al 10/01/2025.

Laboratori partecipanti

Al circuito interlaboratorio sono stati invitati a partecipare i laboratori delle sedi centrali di tutti gli II.ZZ.SS. Inoltre, alcune sezioni periferiche hanno manifestato la volontà di prendere parte al circuito. Infine, anche un laboratorio internazionale (Repubblica San Marino) ha partecipato al circuito. Ciascun laboratorio è stato identificato con un codice numerico assegnato dal portale.

Nel 2024, al circuito "Pannello siero" hanno preso parte 55 laboratori, di cui 54 appartenenti alla rete degli II.ZZ.SS. per un totale di 10 II.ZZ.SS. coinvolti (Tabella 3) e 1 laboratorio estero.

Nel 2024, al circuito "Pannello latte" hanno preso parte 9 laboratori, tutti appartenenti alla rete degli II.ZZ.SS. per un totale di 3 II.ZZ.SS. coinvolti (Tabella 4).

Tabella 3. Lista dei laboratori partecipanti all'edizione 2024 del circuito interlaboratorio per la ricerca di anticorpi contro LEB nel siero.

ENTE PARTECIPANTE	TOTALE LABORATORI PER ENTE PARTECIPANTE
ISSM	1
Laboratorio di Sanità Pubblica - Dipartimento Prevenzione	
IZSAM	5
Diagnostica Pescara	
Sede di Teramo	
Sezione Avezzano	
Sezione Isernia	
Sezione Lanciano	
IZSLER	6
Agenti ad Alta Diffusione e Biotecnologie Diagnostiche Brescia	
Diagnostica Brescia	
Sezione Cremona	
Sezione Parma	
Sierologia Bologna	

Sierologia Modena	
IZSLT	5
Diagnostica indiretta per piani di controllo, profilassi ed eradicazione malattie animali da reddito - Roma	
Sezione Arezzo	
Sezione Rieti	
Sierologia Grosseto	
Sierologia Latina	
IZSME	6
Sezione Reggio Calabria	
Sierologia Caserta	
Sierologia Catanzaro	
Sierologia Cosenza	
Sierologia Salerno	
U.O.S.D. Avellino-Benevento	
IZSPB	8
Diagnostica Sierologica Generale e Speciale - Foggia	
Sezione Brindisi	
Sezione Lecce	
Sezione Matera	
Sezione Putignano	
Sezione Taranto	
Sierologia Potenza	
Virologia Foggia	
IZSSA	3
Sieroimmunologia Sassari	
Sierologia e Virologia Diagnostica Oristano	
Sierologia Nuoro	
IZSSI	5
Piani di Eradicazione - Palermo	
Sierologia Barcellona	
Sierologia Caltanissetta	
Sierologia Catania	
Sierologia Ragusa	
IZSTO	4
Sezione Alessandria	
Sezione Savona	
Sierologia Aosta	
Sierologia Torino	
IZSUM	6
Laboratorio Nazionale Referenza Pesti Suine - Perugia	
Piani di Eradicazione Sorveglianza - Perugia	
Sezione Ancona	
Sezione Fermo	
Sezione Pesaro	
Sezione Tolentino	

IZSVE	6
Diagnostica di Base e Sierologia Pianificata Trento	
Diagnostica Virologica e Sierologica Padova	
Sezione Bolzano	
Sezione Territoriale di Verona	
Sierologia Pianificata Udine	
Sierologia Treviso	
Totale complessivo	55

Tabella 4. Lista dei laboratori partecipanti all'edizione 2024 del circuito interlaboratorio per la ricerca di anticorpi contro LEB nel latte.

ENTE PARTECIPANTE	LABORATORI PER ENTE PARTECIPANTE
IZSSI	3
Piani di Eradicazione - Palermo	
Sierologia Catania	
Sierologia Ragusa	
IZSPLV	2
Sierologia Aosta	
Sierologia Torino	
IZSVE	4
Diagnostica di Base e Sierologia Pianificata Trento	
Diagnostica Virologica e Sierologica Padova	
Sezione Bolzano	
Sierologia Pianificata Udine	
Totale complessivo	9

Risultati

Espressione dei risultati

Per le prove ELISA per la ricerca di anticorpi anti-LEB, da eseguirsi sul pannello siero e/o sul pannello latte, è stato richiesto di esprimere solo il risultato qualitativo (“positivo”, “negativo”, “dubbio”). In caso di campione positivo, l’espressione del risultato “dubbio” è stata ritenuta conforme all’atteso.

Elaborazione dei risultati

Per la valutazione della ripetibilità, della riproducibilità e dell’accuratezza diagnostica sono stati calcolati rispettivamente i seguenti parametri:

- *Accordance*, *Concordance* e *Concordance Odds Ratio (COR)* per la valutazione della variabilità dei risultati intra-laboratorio (ripetibilità) ed inter-laboratorio (riproducibilità)
- Indice di concordanza **Kappa di Cohen (κ)** per la valutazione dell’accuratezza diagnostica in termini di accordo fra gli esiti prodotti da ciascun laboratorio e gli esiti attesi.

Variabilità dei risultati intra-laboratorio: ripetibilità

Per la stima della ripetibilità è stata calcolata l’*Accordance* che rappresenta la probabilità che uno stesso campione, analizzato in doppio in condizioni di ripetibilità, dia luogo allo stesso risultato qualitativo. Questo tipo di valutazione è volta a stimare quanto ciascun laboratorio sia in grado di produrre risultati coerenti in condizioni di ripetibilità e dunque prescinde completamente dai risultati attesi.

In generale, per un collaborative trial che coinvolga L laboratori, ciascuno dei quali analizzi M campioni, l'*Accordance* del circuito è data da:

$$A = \frac{1}{ML} \sum_{\substack{j=1, \dots, M \\ i=1, \dots, L}} \frac{k_i^{(j)}(k_i^{(j)} - 1) + (n_i - k_i^{(j)})(n_i - k_i^{(j)} - 1)}{n_i(n_i - 1)},$$

dove n_i è il numero di repliche eseguite dal laboratorio i -esimo per ciascun campione, mentre $k_i^{(j)}$ è il numero di esiti positivi prodotti dall' i -esimo laboratorio in relazione al j -esimo campione, per $i = 1, \dots, L$ e $j = 1, \dots, M$ (Langton et al., (2002)¹; Massart et al., (2022)²).

Variabilità dei risultati inter-laboratorio: riproducibilità

Per la stima della riproducibilità è stata calcolata la *Concordance* che rappresenta la probabilità che uno stesso campione, inviato ed analizzato in due laboratori diversi, dia luogo allo stesso risultato qualitativo. Anche in questo caso la valutazione prescinde dai risultati attesi in quanto volta a stimare esclusivamente quanto i laboratori siano in grado di produrre risultati coerenti fra di loro.

In generale, per un collaborative trial che coinvolga L laboratori, ciascuno dei quali analizzi gli stessi M campioni, la *Concordance* del circuito è data da:

$$C = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \frac{r^{(j)}(r^{(j)} - 1) + (\sum_{i=1}^L n_i - r^{(j)})(\sum_{i=1}^L n_i - r^{(j)} - 1) - \sum_{i=1}^L [k_i^{(j)}(k_i^{(j)} - 1) + (n_i - k_i^{(j)})(n_i - k_i^{(j)} - 1)]}{\sum_{i=1}^L n_i (\sum_{i=1}^L n_i - 1) - \sum_{i=1}^L [n_i(n_i - 1)]},$$

dove $r^{(j)} = \sum_{i=1}^L k_i^{(j)}$ è il numero di esiti positivi prodotti dal circuito in relazione al j -esimo campione, n_i è il numero di repliche eseguite dal laboratorio i -esimo per ciascun campione e $k_i^{(j)}$ è il numero di esiti positivi prodotti dall' i -esimo laboratorio in relazione al j -esimo campione, per ogni $i = 1, \dots, L$ e $j = 1, \dots, M$ (Langton et al. (2002); Massart et al. (2022)).

Variabilità relativa

Sulla base dei parametri di *Accordance* e *Concordance*, viene calcolato il *Concordance Odds Ratio*:

$$COR := \frac{A(1 - C)}{C(1 - A)}.$$

Questo parametro è meno influenzato dalla sensibilità della prova di quanto non lo siano A e C , e può essere interpretato come una misura della probabilità relativa di osservare lo stesso risultato quando un campione è analizzato in doppio nello stesso laboratorio, rispetto alla situazione in cui invece questo campione venga analizzato in laboratori diversi. Poiché in generale la ripetibilità è maggiore della riproducibilità, l'*Accordance* dovrebbe normalmente superare la *Concordance*, quindi il COR è tendenzialmente un valore superiore ad 1. Maggiore è il valore di COR , maggiore è la variabilità tra i laboratori. Pertanto, idealmente, questo parametro dovrebbe essere prossimo ad 1, situazione nella quale la probabilità di ottenere risultati analoghi non sia influenzata dal fatto che essi siano analizzati dallo stesso laboratorio o da laboratori diversi (Langton et al. (2002); Massart et al. (2022)). Per la valutazione del COR è stato impiegato il test di Fisher e sono stati calcolati i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC95%).

Accuratezza diagnostica

Per la valutazione dell'accuratezza diagnostica delle prove eseguite dai singoli laboratori (e dal circuito nel complesso) è stato calcolato l'indice di concordanza Kappa di Cohen (κ) che misura l'accordo al netto del caso tra gli esiti prodotti da ciascun laboratorio e il *gold standard* rappresentato dalla

¹ Langton SD, Chevennement R, Nagelkerke N, Lombard B. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. Int J Food Microbiol. 2002 Dec 15;79(3):175-81. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00107-1. PMID: 12371652.

² Massart, S., Lebas, B., Chabirand, A., Chappé, A-M, Dreo, T. & Faggioli, F. et al. (2022) Guidelines for improving statistical analyses of validation datasets for plant pest diagnostic tests. EPPO Bulletin, 52, 419–433. Available from: <https://doi.org/10.1111/epp.12862>

classificazione dei campioni del pannello di riferimento in veri positivi e veri negativi. Contestualmente, sono stati calcolati i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC95%) e gli *p-value*, ritenendo significativi *p-value* inferiori o uguali a 0,05. In particolare, se il *p-value* relativo ad un indice κ risulta significativo, allora è possibile escludere, con un certo livello di confidenza, che la concordanza osservata sia in effetti dovuta completamente al caso; diversamente infatti, sarebbe improbabile (probabilità inferiore al 5%) osservare quel valore di κ . Infine, per l'interpretazione dell'indice κ si è fatto riferimento alla scala di Landis and Koch³ che prevede la seguente classificazione:

Tabella 5. Interpretazione indice Kappa di Cohen: scala Landis and Koch.

κ (*)	Livello di accordo
< 0	Pessimo
0,00 – 0,20	Scarso
0,21 – 0,41	Discreto
0,41 – 0,60	Moderato
0,61 – 0,80	Buono
0,81 – 1,00	Ottimo
(*) $\kappa \in [-1,1]$	

Risultati ottenuti per la ricerca di anticorpi sul pannello siero mediante ELISA

I laboratori che hanno preso parte al circuito interlaboratorio relativamente alla prova sierologica ELISA per LEB su siero sono stati 55.

Nella tabella che segue (Tabella 6), sono indicati i kit ELISA impiegati per l'esecuzione delle prove diagnostiche indirette su siero.

Tabella 6. Kit ELISA utilizzati e protocolli.

Kit	Note
ID Screen BLV Blocking gp51 - ID.Vet	---
Bovine Leukosis Virus (BLV) Antibody Test Kit (IDEXX Leukosis Serum X2 Ab) - IDEXX	---
Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) gp51 Antibody Test Kit (IDEXX Leukosis Blocking Ab) - IDEXX	---
ID Screen BLV Competition - ID.Vet	
ALTRO	Kit home made
	Ingezim BLV Compac 2.0 - INGENASA
	Kit in-house ELISA trapping indiretta Ac anti-LBE
	Ingenzim BLV Compac 2.012.BLV.K.3
	BLV COMPAQ GOLD STANDARD

Nelle Tabelle 7-12 sono riportati i risultati delle prove ELISA su siero.

La totalità dei laboratori (n=55) ha prodotto esiti conformi all'atteso per l'intero pannello di campioni di siero, in tutte le repliche eseguite.

Nel complesso del circuito, la percentuale di esiti conformi è stata del 100% sui sieri positivi e del 100% sui sieri negativi (Tabella 12).

³ Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159–174. doi.org/10.2307/2529310.

Tabella 7. Risultati prove ELISA sul pannello siero dei laboratori da L2261 a L2271.

Tabella 7: Risultati prove ELISA sul pannello siero dei laboratori da L2261 a L2271												
Siero ID	Esito atteso	Totale repliche (su 6) conformi all'atteso laboratori L2261-L2271										
		L2261	L2262	L2263	L2264	L2265	L2266	L2267	L2268	L2269	L2270	L2271
S01	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S02	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S03	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S04	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S05	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S06	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S07	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S08	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S09	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S10	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
% repliche conformi		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabella 8. Risultati prove ELISA sul pannello siero dei laboratori da L2272 a L2282.

Tabella di risultati prove ELISA sul campione Siero dei laboratori da L2272 a L2282												
Siero ID	Esito atteso	Totale repliche (su 6) conformi all'atteso laboratori L2272-L2282										
		L2272	L2273	L2274	L2275	L2276	L2277	L2278	L2279	L2280	L2281	L2282
S01	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S02	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S03	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S04	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S05	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S06	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S07	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S08	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S09	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S10	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
% repliche conformi		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabella 9. Risultati prove ELISA sul pannello siero dei laboratori da L2283 a L2294.

Siero ID	Esito atteso	Totale repliche (su 6) conformi all'atteso laboratori L2283-L2294										
		L2283	L2285	L2286	L2287	L2288	L2289	L2290	L2291	L2292	L2293	L2294
S01	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S02	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S03	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S04	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S05	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S06	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S07	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S08	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S09	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S10	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
% repliche conformi		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabella 10. Risultati prove ELISA sul pannello siero dei laboratori da L2295 a L2306.

Siero ID	Esito atteso	Totale repliche (su 6) conformi all'atteso laboratori L2295-L2306										
		L2295	L2296	L2298	L2299	L2300	L2301	L2302	L2303	L2304	L2305	L2306
S01	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S02	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S03	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S04	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S05	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S06	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S07	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S08	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S09	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
S10	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
% repliche conformi		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabella 11. Risultati prove ELISA sul Pannello siero dei laboratori da L2307 a L2317.

Tabella 11: Risultati prove ELISA sul Fianco Siero dei laboratori da L2307 a L2317.													% repliche conformi circuito (su 55 laboratori)
Siero ID	Esito atteso	Totale repliche (su 6) conformi all'atteso laboratori L2307-L2317											
		L2307	L2308	L2309	L2310	L2311	L2312	L2313	L2314	L2315	L2316	L2317	
S01	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S02	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S03	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S04	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S05	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S06	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S07	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S08	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S09	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
S10	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
% repliche conformi		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabella 12. Sintesi risultati ELISA sul pannello siero.

Composizione pannello		Totale repliche	Totale esiti conformi		Totale esiti non conformi	
Esito atteso	N campioni	Circuito	N	%	N	%
Sieri positivi	5	1.650	1.650	100%	0	0%
Sieri negativi	5	1.650	1.650	100%	0	0%

Risultati ottenuti per la ricerca di anticorpi sul pannello latte mediante ELISA

I laboratori che hanno preso parte al circuito interlaboratorio relativamente alla prova sierologica ELISA per LEB su latte sono stati 9. Tutti i laboratori hanno usato il kit: Enzoootic Bovine Leukosis Virus (BLV) Antibody Test Kit (IDEXX Leukosis Milk Screening Ab) – IDEXX e due laboratori con il protocollo overnight.

Nelle tabelle 13-14 sono riportati i risultati delle prove ELISA su latte dove gli esiti dubbi relativi a campioni positivi (complessivamente 17 repliche relative al campione positivo L06) sono stati considerati conformi all'atteso⁴.

Per quanto riguarda la prova ELISA su latte, 7 laboratori hanno prodotto esiti conformi all'atteso sull'intero pannello di campioni in tutte le repliche eseguite.

Due laboratori hanno prodotto 3 e 4 esiti non conformi, tutti falsi negativi.

In particolare, L2286 ha classificato L06 come negativo in 3 repliche su 6; L2310 ha classificato L06 come negativo in 4 repliche su 6.

Nel complesso del circuito, la percentuale di esiti conformi è stata del 97,4% sui latti positivi e del 100% sui latti negativi (Tabella 13).

⁴ Il campione L06 è stato classificato come dubbio rispettivamente da L2285 in una replica, da L2286 in tre repliche, da L2310 in due repliche, da L2266 in sei repliche, da L2281 in cinque repliche.

Tabella 13. Risultati prove ELISA sul pannello latte.

Latte ID	Esito atteso	Totale repliche (su 6) conformi all'atteso per ciascun laboratorio									% repliche conformi circuito
		L2266	L2277	L2281	L2285	L2286	L2293	L2295	L2309	L2310	
L01	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L02	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L03	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L04	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L05	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L06	P	6	6	6	6	3	6	6	6	2	87%
L07	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L08	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L09	P	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
L10	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	100%
% repliche conformi		100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	100%	93,3%	98,7%

Tabella 14. Sintesi risultati prove ELISA sul pannello latte.

Composizione pannello		Totale repliche circuito	Totale esiti conformi		Totale esiti non conformi	
Esito atteso	N campioni		N	%	N	%
Latte positivo	5	270	263	97,4%	7	2,6%
Latte negativo	5	270	270	100%	0	0%

Risultati delle analisi statistiche

Ripetibilità e riproducibilità

Ripetibilità e riproducibilità sul pannello siero mediante ELISA

Nella tabella 15 sono riportati per ciascun campione i risultati di ripetibilità e riproducibilità della prova ELISA su siero relativamente al complesso dei 55 laboratori del circuito.

Tabella 15. Risultati di ripetibilità e riproducibilità per singolo campione relativamente alla prova ELISA su pannello siero.

Siero ID	Esito atteso	Risultati di ripetibilità e riproducibilità della prova per singolo siero	
		Accordance	Concordance
S01	N	100%	100%
S02	P	100%	100%
S03	P	100%	100%
S04	N	100%	100%
S05	P	100%	100%
S06	P	100%	100%
S07	N	100%	100%
S08	P	100%	100%
S09	N	100%	100%
S10	N	100%	100%

Sul pannello dei campioni di siero, il circuito ha mostrato ripetibilità e riproducibilità perfette, con valori di *Accordance* (A) e *Concordance* (C) del 100% (A=100%; C=100%) (Tabella 16).

Tabella 16. Risultati complessivi di ripetibilità e riproducibilità per la prova ELISA su pannello siero.

Risultati di ripetibilità e riproducibilità della prova ELISA su siero - intero pannello				
<i>Accordance</i>	<i>Concordance</i>	<i>COR</i>	<i>COR IC95%</i>	<i>p-value (Fisher test)</i>
100%	100%	1	[1 ; 1]	P>0,05

La differenza tra la variabilità inter-laboratorio e quella intra-laboratorio non è risultata statisticamente significativa.

Ripetibilità e riproducibilità sul pannello latte mediante ELISA

Nella tabella 17 sono riportati per ciascun campione i risultati di ripetibilità e riproducibilità della prova ELISA su latte relativamente al complesso dei 9 laboratori del circuito.

Tabella 17. Risultati di ripetibilità e riproducibilità per singolo campione relativamente alla prova ELISA su pannello latte.

Latte ID	Esito atteso	Risultati di ripetibilità e riproducibilità per singolo latte	
		<i>Accordance</i>	<i>Concordance</i>
L01	P	100%	100%
L02	N	100%	100%
L03	N	100%	100%
L04	P	100%	100%
L05	P	100%	100%
L06	P	87,4%	75,9%
L07	N	100%	100%
L08	N	100%	100%
L09	P	100%	100%
L10	N	100%	100%

Sul pannello di campioni di latte, il circuito ha mostrato mediamente ripetibilità e riproducibilità elevate (A=98,7%; C=97,6%) anche se inferiori a quelle rilevate per quanto riguarda i sieri (Tabella 18).

Tabella 18. Risultati complessivi di ripetibilità e riproducibilità per la prova ELISA su pannello latte.

Risultati di ripetibilità e riproducibilità della prova ELISA su latte - intero pannello				
<i>Accordance</i>	<i>Concordance</i>	<i>COR</i>	<i>COR IC95%</i>	<i>p-value (Fisher test)</i>
98,7%	97,6%	1,93	[1,18 ; 3,37]	p<0,01

La differenza tra la variabilità inter-laboratorio e quella intra-laboratorio è risultata statisticamente significativa.

Accuratezza diagnostica

Accuratezza ELISA sul pannello siero

Nella tabella 19 sono riportati gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e *p-value* per ciascun laboratorio e per l'intero circuito.

Tabella 19. Prova ELISA su pannello siero: risultati di concordanza con l'atteso per singolo laboratorio.

ID laboratorio	κ	IC95%	<i>p-value</i>
Tutti i laboratori (tot 55)	1	[1 ; 1]	<0,0001
Circuito	1	[1 ; 1]	<0,0001

In tutti i singoli laboratori e nel complesso del circuito, la prova ELISA su siero ha rivelato un *ottimo* livello di accordo con l'atteso e dunque un'accuratezza ottima ($\kappa=1,00$ [1-1]).

Accuratezza ELISA sul pannello latte

Nella tabella 20 sono riportati gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e *p-value* per ciascun laboratorio e per l'intero circuito.

Tabella 20. Prova ELISA sul pannello latte: risultati di concordanza con l'atteso per singolo laboratorio.

ID laboratorio	κ	IC95%	<i>p-value</i>
L2266	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2277	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2281	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2285	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2286	0,9	[0,79 ; 1]	<0,0001
L2293	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2295	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2309	1	[1 ; 1]	<0,0001
L2310	0,87	[0,74 ; 0,99]	<0,0001
Circuito	0,97	[0,96 ; 0,99]	<0,0001

In tutti i laboratori, così come nel circuito nel suo complesso, la prova ha dimostrato un *ottimo* livello di accordo con i risultati attesi rivelando quindi un'elevata accuratezza.

Conclusioni

Lo schema utilizzato per la costituzione del pannello di campioni è stato reso quanto più aderente possibile a ciò che prevede la norma di riferimento nella diagnostica di laboratorio della LEB

I risultati espressi dai laboratori italiani sono risultati più che soddisfacenti.

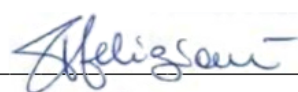
In particolare, alcune criticità sono emerse dai risultati espressi dal test ELISA per la matrice latte. Due laboratori per un solo e identico campione (L06) hanno prodotti dati non conformi all'atteso per alcune repliche. A spiegazione di ciò è necessario considerare quanto segue. Il campione L06 è debolmente positivo, risulta infatti il campione maggiormente diluito. Inoltre, tutti i laboratori, tranne il L2286 e L2310, hanno classificato il campione L06 e le sue repliche come campioni dubbi che statisticamente sono stati considerati positivi. Si ricorda che questo campione è importante ai fini della standardizzazione della prova e indica la massima diluizione (intesa come numero di campioni che possono andare a comporre il pool) che si può utilizzare per i campioni di latte di massa.

Analizzando le repliche di ogni campione di latte esaminato come singoli campioni indipendenti, il circuito ha mostrato mediamente ripetibilità e riproducibilità elevate. In tutti i laboratori che hanno eseguito la prova sul latte, così come nel circuito nel suo complesso, questa ha dimostrato un *ottimo* livello di accordo con i risultati attesi rivelando quindi un'elevata accuratezza.

E' opportuno ricordare che questo metodo non è consentito nei territori in cui l'infezione non è stata eradicata mentre è applicabile solo in caso di sistemi di sorveglianza; nel caso di test basato su latte di massa inoltre è assolutamente fondamentale assicurarsi che il numero di bovine che contribuiscono a formare la mescolanza non impedisca il superamento della soglia di sensibilità del test.

Il responsabile del CEREL
Francesco Feliziani

Perugia, 9 Aprile 2025



Responsabile del Circuito interlaboratorio:

Dott.ssa Carmen Iscaro
Tel.075-3433071
e-mail: c.iscaro@izsum.it
Dott.ssa Maria Serena Beato
Tel.075-343234
e-mail: ms.beato@izsum.it

Responsabili tecnici:

Sig.ra Claudia Pellegrini
e-mail: c.pellegrini@izsum.it

Responsabile Statistico:

Dott.ssa Carmen Maresca
UOS VD Osservatorio Epidemiologico,
e-mail: c.maresca@izsum.it
Tel.075-343285

Dott. Andrea Felici
e-mail: a.felici@izsum.it

Segreteria:

ringtestleucosi@izsum.it

Ringraziamenti

Si ringraziano quanti hanno contribuito all'organizzazione del circuito interlaboratorio, in particolare il personale dell'UO Officina Farmaceutica, per il supporto fornito nella liofilizzazione e confezionamento dei campioni, il personale della UO Gestione Servizi informatici, per la realizzazione dell'applicativo WEB utilizzato per l'iscrizione, la corrispondenza e il ricevimento dei risultati ottenuti da parte dei singoli laboratori, il dott. Piermario Mangili responsabile del Laboratorio Qualità del Latte per il supporto tecnico alla preparazione dei pannelli.