



REPORT

RING TEST 2025

PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA E MOLECOLARE DELLA RINOTRACHEITE INFETTIVA DEL BOVINO (IBR)

Organizzato dal

Centro di Riferenza Nazionale per
la Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR)

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

Tel. 075-3433069

Fax. 075-35047

e.mail: ringtestibr@izsum.it

Sommario

1.	Introduzione.....	3
2.	Descrizione del Ring Test	4
2.1	Selezione dei pannelli di campioni.....	4
2.2	Risultati ottenuti dal CRNIBR	5
2.2.1	Risultati ottenuti nelle prove per la definizione dei pannelli di campioni.....	5
2.2.2	Definizione dei risultati attesi.....	11
2.2.3	Elaborazione statistica dei risultati.....	12
3.	Laboratori partecipanti	13
4.	Risultati ottenuti dai singoli laboratori.....	17
5.	Discussione e conclusioni	44
6.	Ringraziamenti	46

1. Introduzione

Le nuove tecnologie di laboratorio offrono molteplici strumenti per la diagnosi e il controllo del virus erpetico del bovino tipo 1 (BoAHV-1). In quest'ambito, cresce infatti, l'esigenza di valutare le metodiche disponibili sia per la diagnosi individuale sia per le indagini epidemiologiche, al fine di poter individuare correttamente gli opportuni campi d'azione. Come viene suggerito dalla World Organisation for Animal Health (WOAH, Cap. 3.4.11, 2024) la validazione e la standardizzazione dei metodi sono passaggi fondamentali per la diagnosi della Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR)/Vulvovaginite Pustolosa Infettiva (IPV).

Il Regolamento Delegato (UE) 2018/1629 modifica l'elenco delle malattie figuranti nell'allegato II del Regolamento (UE) 2016/429, inserendo l'IBR tra le malattie animali trasmissibili. Il successivo Regolamento (UE) 2018/1882 ha previsto norme di prevenzione e controllo di diverse malattie infettive tra cui l'IBR oltre a stabilire un elenco di specie e gruppi di specie (*Bison ssp.*, *Bos ssp.*, *Bubalus ssp.*, Camelidae e Cervidae) che comportano un notevole rischio di diffusione di tali malattie elencate, tra cui l'IBR. I Regolamenti Delegati (UE) 2020/688, (UE) 2020/689, (UE) 2021/620 stabiliscono per l'IBR prescrizioni in materia di: (i) sorveglianza; (ii) programmi di eradicazione e concessione dello *status* di indennità; (iii) movimentazioni all'interno dell'Unione Europea. Inoltre i Regolamenti Delegati (UE) 2020/686, (UE) 2020/692 prevedono rispettivamente: (i) prescrizioni in materia di sanità animale per i movimenti all'interno dell'Unione di materiale germinale; (ii) norme per l'ingresso nell'Unione e per i movimenti di materiale germinale. Infine il Regolamento (UE) 2020/2002 riguarda la notifica e la comunicazione nell'Unione Europea di differenti malattie elencate nel Regolamento (UE) 2016/429 e successive modifiche e integrazioni, tra cui l'IBR.

Le norme sopramenzionate prevedono la diagnosi e la conferma dei focolai (primari e secondari) di IBR utilizzando le seguenti prove diagnostiche:

- (i) Indirette - ricerca degli anticorpi totali, gB e gE del BoAHV-1 (test ELISA);
- (ii) Dirette - rilievo del virus (isolamento virale) o parte del suo genoma (prove di biologia molecolare).

Il Ministero della Salute, con Decreto del 28 giugno 2016 (Gazzetta Ufficiale n. 227 del 27/09/16), ha istituito, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" (IZSUM), il Centro di Referenza Nazionale per la Rinotracheite Infettiva del Bovino (CRNIBR). Tra le diverse attività istituzionali che competono al Centro, è prevista l'organizzazione di un circuito interlaboratorio. A tale scopo, il CRNIBR nel 2025 ha organizzato un Ring Test per la diagnosi sierologica e molecolare dell'IBR.

L'obiettivo di questo circuito è stato quello di valutare sia la capacità dei laboratori partecipanti di rilevare correttamente anticorpi nei confronti del BoAHV-1 da diverse matrici (siero, latte), sia quella di evidenziare sequenze di DNA virale impiegando metodiche di biologia molecolare (PCR, Real-time PCR) da diversi organi singoli (polmone e trachea) o da pool di organi (trachea, polmone, linfonodi tracheo-bronchiali, milza).

2. Descrizione del Ring Test

2.1 Selezione dei pannelli di campioni

I campioni selezionati sono stati saggiati, definiti e stoccati. Successivamente sono stati liofilizzati, confezionati ed infine rivalutati in diverse condizioni per verificarne la stabilità.

Nelle tabelle seguenti si definiscono i diversi pannelli dei campioni distribuiti (Tabella 1, Tabella 2 e Tabella 3).

Tabella 1. Origine dei campioni di siero inclusi nel Ring Test IBR

Siero	Status	Provenienza animale	Siero non diluito/diluito
S1	Negativo	Azienda indenne	Non diluito
S2	Positivo	Immunizzato con vaccino vivo attenuato	Non diluito
S3	Negativo	Azienda indenne	Non diluito
S4	Positivo	Immunizzato con vaccino deleto (gE-negativo)	Diluizione 1:2
S5	Positivo	Immunizzato con vaccino vivo attenuato	Non diluito
S6	Positivo	Immunizzato con vaccino deleto (gE-negativo)	Non diluito
S7	Positivo	Immunizzato con vaccino vivo attenuato	Diluizione 1:2
S8	Positivo	Immunizzato con vaccino deleto (gE-negativo)	Diluizione 1:4
S9	Positivo	Immunizzato con vaccino vivo attenuato	Diluizione 1:2
S10	Negativo	Azienda indenne	Non diluito

Tabella 2. Origine dei campioni di latte inclusi nel Ring Test IBR

Latte	Status	Latte Singolo / Massa	Provenienza
L1	Negativo	Massa*	Azienda indenne
L2	Positivo	Singolo	Animale infetto
L3	Positivo	Massa**	Azienda sottoposta ad immunizzazione con vaccino deleto gE-negativo
L4	Negativo	Massa***	Azienda indenne
L5	Positivo	Singolo	Animale immunizzato con vaccino deleto gE-negativo

* 40 bovine in lattazione; **11 Bovine in lattazione; *** 25 bovine in lattazione.

Tabella 3. Origine degli omogenati d'organo

Identificativo	Status	Matrice	Provenienza
M1	Positivo	Polmone	Azienda infetta
M2	Negativo	Pool organi	Azienda indenne
M3	Positivo	Polmone	Azienda infetta
M4	Positivo	Pool organi	Azienda infetta
M5	Negativo	Polmone	Azienda indenne
M6	Positivo	Polmone	Azienda infetta
M7	Positivo	Trachea	Azienda infetta
M8	Negativo	Placenta	Azienda indenne
M9	Positivo	Pool organi	Azienda infetta
M10	Positivo	Pool organi	Azienda infetta

Pool di organi: trachea, polmone, linfonodi tracheo-bronchiali, milza.

2.2 Risultati ottenuti dal CRNIBR

Nelle tabelle che seguono si riportano i risultati ottenuti dal CRNIBR sui pannelli (campioni di siero, latte e omogenati d'organi) inviati ai laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio (da Tabella 4 a Tabella 14).

2.2.1 Risultati ottenuti nelle prove per la definizione dei pannelli di campioni

Tabella 4. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi totali anti-IBR dalla matrice siero

Prova	Nome del kit	Tempo Incubazione	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
ELISA	IDEXX ^a	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	IDEXX ^b	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	IDVET ^c	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	IDVET ^c	Overnight	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	GS Diagnostic ^d	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Conclusione risultato CRNIBR			Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.

^a IDEXX IBR Individual; ^b IDEXX IBR Pool; ^c IDVET ID Screen® IBR Indirect; ^d Ingezim® IBR 2.0 12.BHV.K.1, Gold Standard Diagnostics (Ex Ingenasa).

Tabella 5. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-glicoproteina B (gB) dalla matrice siero

Prova	Nome del kit	Tempo Incubazione	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
ELISA	IDEXX ^a	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	IDEXX ^a	Overnight	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	INDICAL ^b	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	INDICAL ^b	Overnight	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	IDVET ^c	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	IDVET ^c	Overnight	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	GS Diagnostic ^d	Short	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Conclusione risultato CRNIBR			Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.

^a IDEXX IBR gB X3; ^b Cattletype® BHV1 gB Ab; ^c IDVET ID Screen® IBR gB Competition; ^d Ingezim® IBR Compact 2.0 12.BHV.K.3, Gold Standard Diagnostics (Ex Ingenasa).

Tabella 6. Ricerca degli anticorpi virus neutralizzanti dalla matrice siero

Prova	Metodo	Tempo Incubazione Siero/virus	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
VN	OIE ^a	24 h	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:1024	1:32	1:512	1:32	1:128	Neg.

^a World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2024), Capitolo 3.4.11, par.2.1.

Tabella 7. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-glicoproteina E (gE) dalla matrice siero

Prova	Nome del kit	Tempo incubazione	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
ELISA	IDEXX ^a	Overnight	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
	IDVET ^b	Overnight	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
	INDICAL ^c	Overnight	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
	GS Diagnostic ^d	Overnight	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Conclusione risultato CRNIBR			Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.

^a IDEXX IBR gE; ^b ID Screen ® IBR gE Competition; ^c Cattletype ® BHV1 gE Ab; ^d Ingezim ® IBR gE 12.IBE.K.3, Gold Standard Diagnostics (Ex Ingenasa).

Tabella 8. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi totali anti-IBR dalla matrice latte

Prova	Nome del kit	Tempo Incubazione	L1	L2	L3	L4	L5
ELISA	IDEXX ^a	Overnight	-	+	+	-	+
	IDEXX ^b	Short	-	+	+	-	+
	IDVET ^c	Short	-	+	+	-	+
	IDVET ^c	Overnight	-	+	+	-	+
	GS Diagnostic ^d	Short	-	+	+	-	+
Conclusione risultato CRNIBR			Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.

^a IDEXX IBR Tank Milk Ab test; ^b IDEXX IBR Pool; ^c IDVET ID Screen® IBR Milk Indirect; ^d Ingezim ® IBR 2.0 12.BHV.K.1, Gold Standard Diagnostics (Ex Ingenasa).

Tabella 9. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-glicoproteina B (gB) dalla matrice latte

Prova	Nome del kit	Tempo Incubazione	L1	L2	L3	L4	L5
ELISA	IDEXX ^a	Overnight	-	+	+	-	+
	IDVET ^b	Short	-	+	+	-	+
	IDVET ^b	Overnight	-	+	+	-	+
	INDICAL ^c	Overnight	-	+	+	-	+
	GS Diagnostic ^d	Short	-	+	+	-	+
	GS Diagnostic ^d	Overnight	-	+	+	-	+
Conclusione risultato CRNIBR			Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.

^a IDEXX IBR gB X3; ^b IDVET ID Screen ® IBR gB Competition; ^c Cattletype® BHV1 gB Ab; ^d Ingezim ® IBR Compact 2.0 12.BHV.K.3, Gold Standard Diagnostics (Ex Ingenasa).

Tabella 10. Test ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-glicoproteina E (gE) dalla matrice latte

Prova	Nome del kit	Tempo Incubazione	L1	L2	L3	L4	L5
ELISA	IDEXX ^a	Overnight	-	+	-	-	-
	IDVET ^b	Short	-	+	-	-	-
	IDVET ^b	Overnight	-	+	-	-	-
	INDICAL ^c	Overnight	-	+	-	-	-
	GS Diagnostic ^d	Overnight	-	+	-	-	-
	IN3DIAGNOSTIC ^e	Overnight	-	+	-	-	-
Conclusione risultato CRNIBR			Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.

^a IDEXX IBR gE; ^b IDVET ID Screen ® IBR gE Competition; ^c Cattletype® BHV1 gE Ab; ^d Ingezim ® IBR gE 12.IBE.K.3, Gold Standard Diagnostics (Ex Ingenasa); ^e Eradikit™ BoHV1-gE Bulk Milk Surveillance kit plus.

Tabella 11. Ricerca del genoma virale mediante End-point PCR

Prova	Kit di estrazione impiegato	Protocollo impiegato	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
End – point PCR	1	a	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
End – point PCR	2	a	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Conclusione risultato CRNIBR			Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.

¹ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche); ² Qiasymphony DSP Virus/Pathogen (Qiagen); ^a, De Giuli *et al.*, 2002, *J Vet Diagn Invest*, 14, 353-356.

Tabella 12. Ricerca del genoma virale mediante Real-time PCR gB

Prova	Kit di estrazione impiegato	Protocollo impiegato	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Real-time PCR (gB)	1	a	23,2	Neg.	28,3	24,2	Neg.	31,1	23,2	Neg.	25,9	27,4
Real-time PCR (gB)	2	a	24,4	Neg.	29,5	25,4	Neg.	32,3	24,3	Neg.	27,1	28,5
Conclusione risultato CRNIBR			Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.

¹ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche); ² Qiasymphony DSP Virus/Pathogen (Qiagen); ^a, OIE Manual for Terrestrial Animals, 2018, Cap. 3.4.11, Parte B.1.3.

Tabella 13. Ricerca del genoma virale mediante Real-time PCR gD

Prova	Kit di estrazione impiegato	Protocollo impiegato	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Real-time PCR (gD)	1	b	25,7	Neg.	31,8	24,2	Neg.	34,1	25,6	Neg.	28,3	29,7
Real-time PCR (gD)	2	b	26,4	Neg.	32,6	27,1	Neg.	34,9	26,3	Neg.	29	30,4
Conclusione risultato CRNIBR			Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.

¹ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche); ² Qiasymphony DSP Virus/Pathogen (Qiagen); ^b, Wernike *et al.*, 2011, *J Virol Methods*, 174(1-2):77-84.

Tabella 14. Ricerca del genoma virale mediante Real-time PCR gE

Prova	Kit di estrazione impiegato	Protocollo impiegato	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Real-time PCR (gE)	1	b	24,2	Neg.	29,8	24,6	Neg.	31,6	24,3	Neg.	26,7	28,1
Real-time PCR (gE)	2	b	25,4	Neg.	30,9	25,8	Neg.	32,7	25,5	Neg.	27,8	29,2
Conclusione risultato CRNIBR			Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.

¹ High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche); 2 Qiasymphony DSP Virus/Pathogen (Qiagen); ^b, Wernike *et al.*, 2011, *J Virol Methods*, 174(1-2):77-84.

2.2.2 Definizione dei risultati attesi

In base alle prove effettuate dal CRNIBR è stato possibile definire i risultati attesi rispetto alle diverse prove e alle differenti matrici considerate nel presente circuito. Questi risultati sono di seguito schematicamente rappresentati (Tabella 15, Tabella 16 e Tabella 17).

Tabella 15. Campioni di siero

Prova	ELISA Ac Totali	ELISA gB	ELISA gE	VN
S1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
S2	Pos.	Pos.	Pos.	1:256
S3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
S4	Pos.	Pos.	Neg.	1:8
S5	Pos.	Pos.	Pos.	1:1024
S6	Pos.	Pos.	Neg.	1:32
S7	Pos.	Pos.	Pos.	1:512
S8	Pos.	Pos.	Neg.	1:32
S9	Pos.	Pos.	Pos.	1:128
S10	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Tabella 16. Campioni di latte

Prova	ELISA Ac Totali	ELISA gB	ELISA gE
L1	Neg.	Neg.	Neg.
L2	Pos.	Pos.	Pos.
L3	Pos.	Pos.	Neg.
L4	Neg.	Neg.	Neg.
L5	Pos.	Pos.	Neg.

Tabella 17. Campioni d'organo

Prova	End-point PCR	Real-time PCR		
		gB	gD	gE
M1	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
M2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
M3	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
M4	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
M5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
M6	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
M7	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
M8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
M9	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
M10	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.

2.2.3 Elaborazione statistica dei risultati

In primo luogo sono stati prodotti i risultati di **riproducibilità diagnostica** relativamente alle seguenti prove:

- Diagnosi sierologica di IBR mediante kit ELISA (matrice siero; matrice latte)
- Diagnosi sierologica di IBR mediante prova di virus neutralizzazione (matrice siero)
- Diagnosi virologica di IBR mediante End-point PCR e Real Time PCR (matrice omogenati d'organo)

La riproducibilità è stata valutata per ciascun laboratorio (e per il circuito nel suo complesso) mediante calcolo dell'indice di concordanza **Kappa di Cohen (κ)** che misura la concordanza al netto del caso tra tutti gli esiti prodotti dal laboratorio e il gold standard rappresentato dalla 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 i **p-value**, ritenendo significativi p-value inferiori o uguali a 0,05.

Per l'interpretazione dell'indice κ si è fatto riferimento alla scala di Landis & Koch¹ (Tabella 18) che prevede la seguente classificazione:

Tabella 18. Interpretazione indice Kappa di Cohen: scala Landis and Koch.

κ (*)	Livello di concordanza
< 0	Mediocre
0,00 – 0,20	Scarsa
0,21 – 0,41	Discreta
0,41 – 0,60	Moderata
0,61 – 0,80	Buona
0,81 – 1,00	Ottima

(*) $\kappa \in [-1,1]$

Nel caso dei campioni di siero **veri positivi**, è stata valutata la **riproducibilità della prova di virus neutralizzazione** mediante il calcolo del **coefficiente di variazione CV** del logaritmo decimale della diluizione refertata. Infine, tramite il **test Z**, è stato valutato lo scostamento della distribuzione di ogni singolo campione rispetto al valore atteso considerando significativo un p-value $\leq 0,05$.

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

3. Laboratori partecipanti

Il Centro di Referenza Nazionale per la Rinotracheite Infettiva del Bovino si avvale di un sistema informatizzato (<https://view.izsum.it/ringtest/>) per la gestione del circuito interlaboratorio. Tramite il portale, i laboratori degli IZ.SS. sono stati invitati a partecipare al Ring Test 2025 per la diagnosi sierologica e molecolare della Rinotracheite infettiva del bovino (IBR). Successivamente i partecipanti si sono iscritti ed hanno selezionato le prove diagnostiche. Al termine hanno inserito i risultati ottenuti.

Nel 2025, al circuito interlaboratorio hanno partecipato complessivamente 44 laboratori, di cui 41 situati presso i 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZ.SS.) e 1 appartenente all'Università degli Studi di Torino. Inoltre quest'anno hanno partecipato al Ring Test, il laboratorio di riferimento europeo dell'organizzazione mondiale della sanità animale (WOAH) del Friedrich-Loeffler Institut (FLI), in Germania e il laboratorio nazionale di riferimento francese per l'IBR appartenente all'agenzia nazionale per la sicurezza alimentare, ambientale e sul lavoro (ANSES), in Francia.

Ciascun laboratorio coinvolto nell'elaborazione è stato identificato con un codice numerico assegnato dal sistema informatizzato. Nella Tabella 19 è riportato l'elenco dei laboratori partecipanti, con un numero progressivo (N. progr.), l'organizzazione e il laboratorio/sede di appartenenza, mentre nella Tabella 20 sono elencate le prove eseguite da ciascuno di essi.

Tabella 19. Lista dei laboratori partecipanti all'edizione 2025 del circuito interlaboratorio IBR.

N. progr.	Organizzazione	Laboratorio/Sede
1	IZSAM	Virologia Teramo
2		Diagnostica Sondrio
3		Sierologia Binago
4		Sezione Pavia
5		Sierologia Brescia
6		Virologia Brescia
7	IZSLER	Sezione Cremona
8		Sezione Parma
9		Sezione Mantova
10		Sezione Reggio Emilia
11		Sezione Bergamo
12		Sezione Lodi
13	IZSLT	Sezione Arezzo
14		Diagnosi malattie virali - Roma
15		Sezione Rieti
16		Sierologia Latina
17		Sierologia Grosseto
18		UOC. Virologia -Roma
19	IZSM	Sierologia Salerno
20		Sierologia Caserta

N. progr.	Organizzazione	Laboratorio/Sede
21		Sezione Catanzaro
22		Sierologia Benevento
23		Sezione di Cosenza
24		UOS Diagnostica Virologica e Colture Cellulari - Napoli
25	IZSPB	Diagnostica Virologica Generale e Speciale
26		Lab. Colture Cellulari
27	IZSSA	Virologia Sassari
28		Sieroimmunologia Sassari
29	IZSSI	Diagnostica delle Malattie Virali - Area Diagnostica Virologica (Palermo)
30	IZSTO	Sierologia Torino
31		Virologia Aosta
32		Sezione Savona
33		Sezione Cuneo
34		Virologia Torino
35	IZSUM	Virologia Speciale Perugia
36	IZSVe	Diagnostica di Base e Sierologia Pianificata Trento
37		Lab. Virologia diagnostica - U.O. Biologia Molecolare - Padova
38		Sezione Bolzano
39		Sierologia, Malattie Pianificate e Virologia Diagnostica - Padova
40		Sierologia Pianificata Udine
41		Sezione di Treviso
42	UNITO	Dipartimento di Scienze Veterinarie
43	FLI	WOAH and National Reference Laboratory (NRL) for Bovine Herpesvirus type 1 infection - German NRL, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Greifswald, Insel Riems, Germany
44	ANSES	National Reference Laboratory (NRL) for IBR, Laboratory Ploufragan-Plouzané-Niort, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), France

Tabella 20. Prove eseguite per ogni partecipante all'edizione 2025 del circuito interlaboratorio IBR.

N. progr.	Prove sierologiche						Prove molecolari				
	ELISA (matrice siero)			VN	ELISA (matrice latte)			End- point PCR	Real Time PCR*	Real Time PCR**	
	Ac. tot.	Ac. gB	Ac. gE		Ac. tot	Ac. gB	Ac. gE		gB	gD	gE
1		x	x	x		x	x		x		
2	x				x		x				
3			x				x				
4			x				x				
5			x				x				
6		x	x	x		x	x		x		
7		x	x			x	x				
8		x	x			x	x		x		
9			x				x		x		
10			x				x				
11			x				x				
12			x				x		x		
13		x	x								
14		x	x	x		x	x				
15		x	x								
16		x	x								
17		x	x								
18									x		
19		x	x								
20		x	x								
21		x	x								
22		x	x								
23		x	x								
24		x	x	x					x		
25		x	x						x		
26				x							
27				x					x		
28		x	x								
29		x	x		x						
30							x				
31	x	x	x								
32	x	x	x								
33	x	x	x		x		x				
34	x	x	x	x					x		

N. progr.	Prove sierologiche							Prove molecolari			
	ELISA (matrice siero)			VN	ELISA (matrice latte)			End- point PCR	Real Time PCR*	Real Time PCR**	
	Ac. tot.	Ac. gB	Ac. gE		Ac. tot	Ac. gB	Ac. gE		gB	gD	gE
35		x	x	x		x	x	x	x	x	x
36	x	x	x		x						
37									x	x	x
38	x				x						
39	x	x	x	x							
40	x	x	x		x						
41	x	x	x					x	x	x	
42	x				x		x				
43	x	x	x	x	x					x	x
44		x	x		x				x	x	x
Totale	12	29	37	10	9	6	17	2	14	5	4

* Protocollo WOA; ** Protocollo Wernike et al., 2011.

4. Risultati ottenuti dai singoli laboratori

Tabella 21. Prova ELISA anticorpo totali dalla matrice siero

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Kit	Protocollo utilizzato
1030	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Homemade Ac TOTALI	Overnight
2341	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2342	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Homemade Ac TOTALI	Short
2350	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2372	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2373	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Short
2374	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2378	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2379	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2391	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
2418	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID screen IBR indirect - ID.vet	Overnight
5454	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX BHV-1trachitest serum screening	Overnight
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.		Short/Overnight

Di seguito sono riportati per ciascun laboratorio e per l'intero circuito gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e p -value (Tabella 22). Fatta eccezione per il **laboratorio 2342**, che ha mostrato un livello di **concordanza moderata ($\kappa=0,60$ [0,27-1])**, tutti gli altri laboratori hanno rivelato un livello di concordanza ottimo, con un alto livello di significatività, e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso ($\kappa=0,96$ [0,91-1]) dimostrando quindi un'elevata accuratezza.

Tabella 22. Risultati di riproducibilità di ELISA anticorpo totali dalla matrice siero per IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p -value
1030	1	[1 ; 1]	0,0008
2341	1	[1 ; 1]	0,0008
2342	0,60	[0,27 ; 1]	0,0192
2350	1	[1 ; 1]	0,0008
2372	1	[1 ; 1]	0,0008
2373	1	[1 ; 1]	0,0008
2374	1	[1 ; 1]	0,0008
2378	1	[1 ; 1]	0,0008
2379	1	[1 ; 1]	0,0008
2391	1	[1 ; 1]	0,0008
2418	1	[1 ; 1]	0,0008
5454	1	[1 ; 1]	0,0008
Circuito	0,96	[0,91 ; 1]	0,0000

Tabella 23. Prova ELISA anticorpi anti-glicoproteina B (gB) dalla matrice siero

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Kit	Protocollo utilizzato
2018	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Short
2047	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2341	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Overnight
2345	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2347	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Short
2349	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2355	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2362	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2364	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2372	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2373	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2374	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Overnight
2375	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2378	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Overnight
2379	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Overnight

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Kit	Protocollo utilizzato
2380	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2382	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2391	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Overnight
2392	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2396	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2397	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Short
2398	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Short
2414	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2415	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Overnight
2416	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Overnight
2417	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2418	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
3232	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Short
5454	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Indical BHV-1 gB Blocking	Overnight
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.		Short/Overnight

Di seguito sono riportati per ciascun laboratorio e per l'intero circuito gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e *p-value* (Tabella 24).
Tutti i laboratori hanno mostrato un **livello di concordanza ottima** e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso.

Tabella 24. Risultati di riproducibilità di ELISA anticorpi anti-glicoproteina B (gB) dalla matrice siero per IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018	1	[1 ; 1]	0,0008
2047	1	[1 ; 1]	0,0008
2341	1	[1 ; 1]	0,0008
2345	1	[1 ; 1]	0,0008
2347	1	[1 ; 1]	0,0008
2349	1	[1 ; 1]	0,0008
2355	1	[1 ; 1]	0,0008
2362	1	[1 ; 1]	0,0008
2364	1	[1 ; 1]	0,0008
2372	1	[1 ; 1]	0,0008
2373	1	[1 ; 1]	0,0008
2374	1	[1 ; 1]	0,0008
2375	1	[1 ; 1]	0,0008
2378	1	[1 ; 1]	0,0008
2379	1	[1 ; 1]	0,0008
2380	1	[1 ; 1]	0,0008
2382	1	[1 ; 1]	0,0008
2391	1	[1 ; 1]	0,0008
2392	1	[1 ; 1]	0,0008

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2396	1	[1 ; 1]	0,0008
2397	1	[1 ; 1]	0,0008
2398	1	[1 ; 1]	0,0008
2414	1	[1 ; 1]	0,0008
2415	1	[1 ; 1]	0,0008
2416	1	[1 ; 1]	0,0008
2417	1	[1 ; 1]	0,0008
2418	1	[1 ; 1]	0,0008
3232	1	[1 ; 1]	0,0008
5454	1	[1 ; 1]	0,0008
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 25. Prova di virus neutralizzazione (VN)

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
2018	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:1024	1:32	1:512	1:32	1:128	Neg.
2338	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:512	1:32	1:256	1:32	1:128	Neg.
2362	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:1024	1:8	1:256	1:16	1:64	Neg.
2372	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:2048	1:16	1:512	1:16	1:256	Neg.
2375	Neg.	1:128	Neg.	1:16	1:2048	1:64	1:1024	1:32	1:256	Neg.
2379	Neg.	1:128	Neg.	1:8	1:1024	1:16	1:256	1:16	1:128	Neg.
2397	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:1024	1:16	1:512	1:32	1:128	Neg.
2417	Neg.	1:512	Neg.	1:16	1:1024	1:64	1:1024	1:64	1:256	Neg.
2420	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:1024	1:16	1:512	1:32	1:128	Neg.
5454	Neg.	1:512	Neg.	1:16	1:1024	1:16	1:512	1:16	1:96	Neg.
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	1:256	Neg.	1:8	1:1024	1:32	1:512	1:32	1:128	Neg.

Con riferimento ai soli campioni veri positivi del pannello sierologico, di seguito si riporta il logaritmo decimale delle diluizioni ottenute da ciascun laboratorio per ogni campione e i relativi Coefficienti di Variabilità (CV; Tabella 26). Il test Z non ha mostrato differenze ($p\text{-value} > 0,05$) tra l'esito dei laboratori e l'esito atteso.

Tabella 26. Prova di VN: Log (diluizione) per ciascun campione positivo e laboratorio

ID laboratorio	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9
2018	2,41	0,90	3,01	1,51	2,71	1,51	2,11
2338	2,41	0,90	2,71	1,51	2,41	1,51	2,11
2362	2,41	0,90	3,01	0,90	2,41	1,20	1,81
2372	2,41	0,90	3,31	1,20	2,71	1,20	2,41
2375	2,11	1,20	3,31	1,81	3,01	1,51	2,41
2379	2,11	0,90	3,01	1,20	2,41	1,20	2,11
2397	2,41	0,90	3,01	1,20	2,71	1,51	2,11
2417	2,71	1,20	3,01	1,81	3,01	1,81	2,41
2420	2,41	0,90	3,01	1,20	2,71	1,51	2,11
5454	2,71	1,20	3,01	1,20	2,71	1,20	1,98
<i>Esiti attesi</i>	2,41	0,90	3,01	1,51	2,71	1,51	2,11
Media circuito	2,41	0,99	3,04	1,35	2,68	1,41	2,15
Dev. Standard	0,20	0,15	0,17	0,29	0,22	0,20	0,20
CV	8,3%	14,6%	5,6%	21,6%	8,3%	14,4%	9,2%
Test z (p-value)	0,5000	0,0537	0,5768	0,0810	0,6663	0,1139	0,5271

Il CV oscilla tra un valore minimo di 5,6% (S5) ad un massimo di 21,6% (S6), con una media del 11,7% nel complesso dei campioni positivi. Nella Figura 1 è riportata per ciascun campione positivo la distribuzione dei logaritmi decimali delle diluizioni, il relativo valore medio e il valore atteso. Nella Figura 2 sono riportati i logaritmi decimali del rapporto fra la diluizione refertata e quella attesa per ciascun campione positivo e laboratorio

Figura 1. Prova di VN per IBR: Log (diluizioni) per ciascun campione positivo e laboratorio, media del circuito e valore atteso.

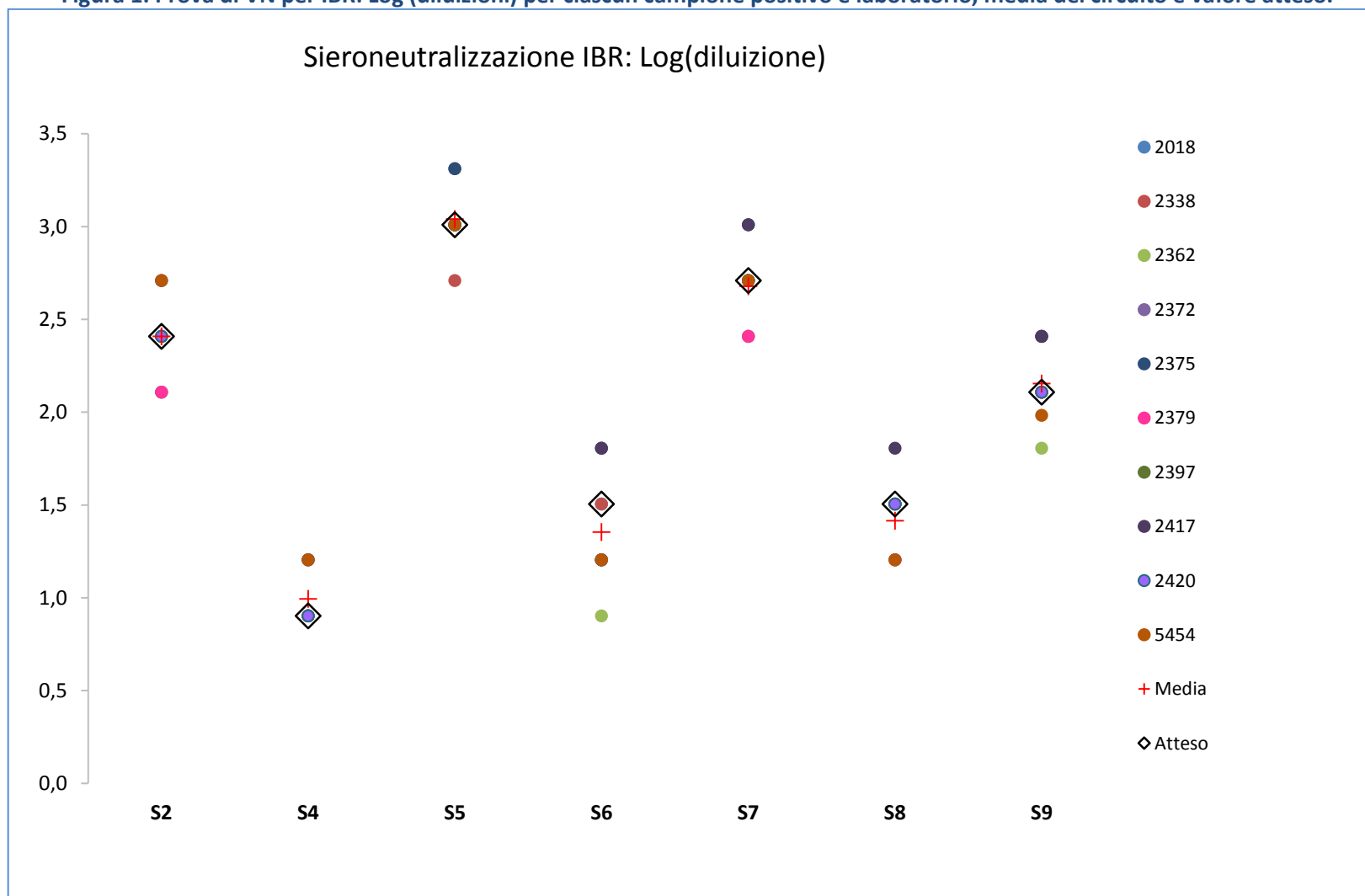


Figura 2. Prova VN per IBR: Logaritmo decimale del rapporto fra la diluizione refertata e quella attesa per ciascun campione positivo e laboratorio.

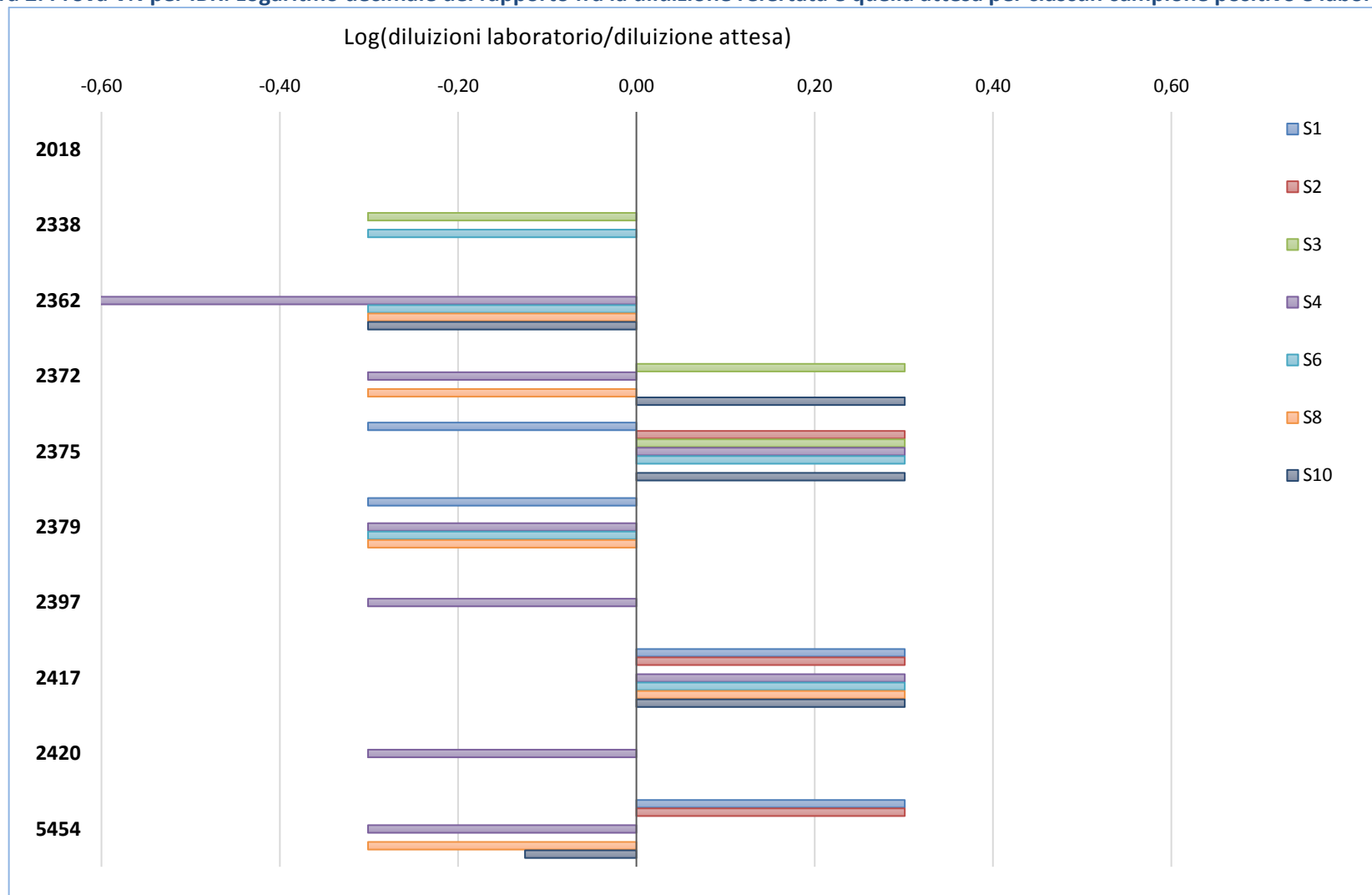


Tabella 27. Prova ELISA anticorpi anti-glicoproteina E (gE) dalla matrice siero

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Kit	Protocollo utilizzato
2018	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Overnight
2047	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Short
2341	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2342	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2343	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2344	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2345	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2347	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	INgezim IBR gE – G.S. Diagnostic	Overnight
2348	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2349	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2355	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Short
2362	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2364	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2372	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2373	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Kit	Protocollo utilizzato
2374	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2375	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	INgezim IBR gE – G.S. Diagnostic	Overnight
2378	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2379	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Short
2380	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2382	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2384	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2385	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2386	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2387	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2391	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2392	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	INgezim IBR gE – G.S. Diagnostic	Overnight
2396	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2397	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Overnight
2398	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	INgezim IBR gE – G.S. Diagnostic	Short
2414	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	INgezim IBR gE – G.S. Diagnostic	Overnight

ID Laboratorio	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Kit	Protocollo utilizzato
2415	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Overnight
2416	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Overnight
2417	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2418	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
3232 – A	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Overnight
3232 – B	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
5454	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.		Short/ Overnight

Di seguito sono riportati per ciascun laboratorio e per l'intero circuito gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e *p-value* (Tabella 28). Tutti i laboratori hanno mostrato un **livello di concordanza ottima** e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso.

Tabella 28. Risultati di riproducibilità di ELISA anticorpi anti-glicoproteina E (gE) dalla matrice siero per IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018	1	[1 ; 1]	0,0008
2047	1	[1 ; 1]	0,0008
2341	1	[1 ; 1]	0,0008
2342	1	[1 ; 1]	0,0008
2343	1	[1 ; 1]	0,0008
2344	1	[1 ; 1]	0,0008
2345	1	[1 ; 1]	0,0008
2347	1	[1 ; 1]	0,0008
2348	1	[1 ; 1]	0,0008
2349	1	[1 ; 1]	0,0008
2355	1	[1 ; 1]	0,0008
2362	1	[1 ; 1]	0,0008
2364	1	[1 ; 1]	0,0008
2372	1	[1 ; 1]	0,0008
2373	1	[1 ; 1]	0,0008
2374	1	[1 ; 1]	0,0008
2375	1	[1 ; 1]	0,0008
2378	1	[1 ; 1]	0,0008
2379	1	[1 ; 1]	0,0008
2380	1	[1 ; 1]	0,0008
2382	1	[1 ; 1]	0,0008

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2384	1	[1 ; 1]	0,0008
2385	1	[1 ; 1]	0,0008
2386	1	[1 ; 1]	0,0008
2387	1	[1 ; 1]	0,0008
2391	1	[1 ; 1]	0,0008
2392	1	[1 ; 1]	0,0008
2396	1	[1 ; 1]	0,0008
2397	1	[1 ; 1]	0,0008
2398	1	[1 ; 1]	0,0008
2414	1	[1 ; 1]	0,0008
2415	1	[1 ; 1]	0,0008
2416	1	[1 ; 1]	0,0008
2417	1	[1 ; 1]	0,0008
2418	1	[1 ; 1]	0,0008
3232 – A	1	[1 ; 1]	0,0008
3232 – B	1	[1 ; 1]	0,0008
5454	1	[1 ; 1]	0,0008
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 29. Prove ELISA anticorpi totali dalla matrice latte

ID Laboratorio	L1	L2	L3	L4	L5	Kit	Protocollo utilizzato
1030	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Homemade Ac TOTALI	Overnight
2341	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX BHV-1 Bulk Milk - IDEXX	Overnight
2342	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Homemade Ac TOTALI	Short
2350	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX BHV-1 Bulk Milk - IDEXX	Overnight
2378	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	ID screen IBR milk indirect - ID.vet	Overnight
2391	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX BHV-1 Bulk Milk - IDEXX	Overnight
2416	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX BHV-1 Bulk Milk - IDEXX	Overnight
3232 – A	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX IBR Pool	Overnight
3232 – B	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX BHV-1 Bulk Milk - IDEXX	Overnight
5454 – A	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	ID screen IBR milk indirect - ID.vet	Overnight
5454 – B	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX BHV-1 Bulk Milk - IDEXX	Overnight
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.		Short/Overnight

Di seguito sono riportati per ciascun laboratorio e per l'intero circuito gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e *p-value* (Tabella 30). Tutti i laboratori hanno rivelato un livello di concordanza ottimo, con un alto livello di significatività.

Tabella 30. Risultati di riproducibilità di ELISA anticorpo totali dalla matrice latte per IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	<i>p-value</i>
1030	1	[1 ; 1]	0,0127
2341	1	[1 ; 1]	0,0127
2342	1	[1 ; 1]	0,0127
2350	1	[1 ; 1]	0,0127
2378	1	[1 ; 1]	0,0127
2391	1	[1 ; 1]	0,0127
2416	1	[1 ; 1]	0,0127
3232 – A	1	[1 ; 1]	0,0127
3232 – B	1	[1 ; 1]	0,0127
5454 – A	1	[1 ; 1]	0,0127
5454 – B	1	[1 ; 1]	0,0127
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 31. Prova ELISA anticorpi anti-glicoproteina B (gB) dalla matrice latte

ID Laboratorio	L1	L2	L3	L4	L5	Kit	Protocollo utilizzato
2018	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Short
2362	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2364	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2375	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Overnight
2380	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	ID Screen IBR gB Competition - ID.vet	Short
2397	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	IDEXX IBR gB X3 - IDEXX	Overnight
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.		Short/Overnight

Tutti i laboratori hanno mostrato un **livello di concordanza ottima** ($\kappa=1$ [1-1]) e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso (Tabella 32).

Tabella 32. Risultati di riproducibilità di ELISA anticorpi anti-glicoproteina B (gB) dalla matrice latte per IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018	1	[1 ; 1]	0,0127
2362	1	[1 ; 1]	0,0127
2364	1	[1 ; 1]	0,0127
2375	1	[1 ; 1]	0,0127
2380	1	[1 ; 1]	0,0127
2397	1	[1 ; 1]	0,0127
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 33. Prova ELISA anticorpi anti-glicoproteina E (gE) dalla matrice latte

ID Laboratorio	L1	L2	L3	L4	L5	Kit	Protocollo utilizzato
1030	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Eradikit™ BoHV1-gE Bulk Milk Surveillance kit PLUS - IN3 diagnostic	Overnight
2018	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Short
2342	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2343	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2344	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2348	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2358	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Eradikit™ BoHV1-gE Bulk Milk Surveillance kit PLUS - IN3 diagnostic	Overnight
2362	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2364	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2375	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	INgezim IBR gE – G.S. Diagnostic	Overnight
2378	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Eradikit™ BoHV1-gE Bulk Milk Surveillance kit PLUS - IN3 diagnostic	Overnight
2380	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2384	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2385	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2386	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Overnight
2387	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	ID Screen IBR gE Competition - ID.vet	Short
2397	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	IDEXX IBR gE - IDEXX	Overnight
Risultati attesi dal CRNIBR	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.		Short/ Overnight

Tutti i laboratori hanno mostrato un **livello di concordanza ottima** ($\kappa=1$ [1-1]) e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso (Tabella 34).

Tabella 34. Risultati di riproducibilità di ELISA anticorpi anti-glicoproteina E (gE) dalla matrice latte per IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
1030	1	[1 ; 1]	0,0127
2018	1	[1 ; 1]	0,0127
2342	1	[1 ; 1]	0,0127
2343	1	[1 ; 1]	0,0127
2344	1	[1 ; 1]	0,0127
2348	1	[1 ; 1]	0,0127
2358	1	[1 ; 1]	0,0127
2362	1	[1 ; 1]	0,0127
2364	1	[1 ; 1]	0,0127
2375	1	[1 ; 1]	0,0127
2378	1	[1 ; 1]	0,0127
2380	1	[1 ; 1]	0,0127
2384	1	[1 ; 1]	0,0127
2385	1	[1 ; 1]	0,0127
2386	1	[1 ; 1]	0,0127
2387	1	[1 ; 1]	0,0127
2397	1	[1 ; 1]	0,0127
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 35: Prova di End-point PCR

ID Laboratorio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Kit estrazione	Protocollo di amplificazione
2018 – A	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	2	A
2018 – B	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	3	A
2418	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	1	A
<i>Risultati attesi dal CRNIBR</i>	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.		

Il laboratorio ha mostrato un livello di **concordanza ottima** ($\kappa=1$ [1-1]) e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso (Tabella 36).

Tabella 36: Risultati di riproducibilità di End-point PCR relativamente al laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018 – A	1	[1 ; 1]	0,0008
2018 – B	1	[1 ; 1]	0,0008
2418	1	[1 ; 1]	0,0008
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 37. Prova di Real-time PCR (gB)

ID Laboratorio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Kit estrazione	Protocollo di amplificazione
2018 – A	Pos. (23,2)	Neg.	Pos. (28,3)	Pos. (24,2)	Neg.	Pos. (31,1)	Pos. (23,2)	Neg.	Pos. (25,9)	Pos. (27,4)	2	B
2018 – B	Pos. (24,4)	Neg.	Pos. (29,5)	Pos. (25,4)	Neg.	Pos. (32,3)	Pos. (24,3)	Neg.	Pos. (27,1)	Pos. (28,5)	3	B
2338	Pos. (24,08)	Neg.	Pos. (28,1)	Pos. (23,2)	Neg.	Pos. (30,1)	Pos. (22,6)	Neg.	Pos. (25,6)	Pos. (27,4)	4	B
2346	Pos. (23,8)	Neg.	Pos. (28,05)	Pos. (23,35)	Neg.	Pos. (31,03)	Pos. (22,34)	Neg.	Pos. (25,1)	Pos. (27,51)	5	B
2362	Pos. (22,33)	Neg.	Pos. (28,38)	Pos. (23,92)	Neg.	Pos. (31,38)	Pos. (23,1)	Neg.	Pos. (25,67)	Pos. (27,98)	6	B
2379	Pos. (22,69)	Neg.	Pos. (28)	Pos. (22,72)	Neg.	Pos. (34,33)	Pos. (22,6)	Neg.	Pos. (25,2)	Pos. (27,46)	7	B
2380	Pos. (24)	Neg.	Pos. (29)	Pos. (25)	Neg.	Pos. (32)	Pos. (24)	Neg.	Pos. (27)	Pos. (29)	6	B
2382	Pos. (23)	Neg.	Pos. (29)	Pos. (23)	Neg.	Pos. (32)	Pos. (23)	Neg.	Pos. (27)	Pos. (28)	8	C
2384	Pos. (22,41)	Neg.	Pos. (27,83)	Pos. (23,25)	Neg.	Pos. (30,57)	Pos. (22,21)	Neg.	Pos. (24,87)	Pos. (26,88)	6	B
2387	Pos. (25)	Neg.	Pos. (31)	Pos. (26)	Neg.	Pos. (33)	Pos. (25)	Neg.	Pos. (28)	Pos. (30)	9	B
2397	Pos. (24,3)	Neg.	Pos. (29,3)	Pos. (24,5)	Neg.	Pos. (32,1)	Pos. (23,8)	Neg.	Pos. (26,8)	Pos. (28,2)	10	D
2417	Pos. (22,8)	Neg.	Pos. (28,6)	Pos. (23,8)	Neg.	Pos. (30,7)	Pos. (23,2)	Neg.	Pos. (25,3)	Pos. (27)	11	B
2418	Pos. (23,22)	Neg.	Pos. (29,08)	Pos. (24,33)	Neg.	Pos. (31,59)	Pos. (23,27)	Neg.	Pos. (26,23)	Pos. (28,08)	1	B
5454	Pos. (22,1)	Neg.	Pos. (27,5)	Pos. (23)	Neg.	Pos. (31,7)	Pos. (23,2)	Neg.	Pos. (24,8)	Pos. (27)	12	D
8820	Pos. (24,34)	Neg.	Pos. (29,52)	Pos. (24,21)	Neg.	Pos. (31,64)	Pos. (22,43)	Neg.	Pos. (26,36)	Pos. (28,5)	13	E

ID Laboratorio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Kit estrazione	Protocollo di amplificazione
<i>Risultati attesi dal CRNIBR</i>	<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Pos.</i>		

Di seguito sono riportati per ciascun laboratorio e per l'intero circuito gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e *p-value* (Tabella 38). Tutti i laboratori hanno mostrato un **livello di concordanza ottima** ($\kappa=1$ [1-1]) e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso.

Tabella 38. Risultati di riproducibilità di PCR Real time IBR relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018 – A	1	[1 ; 1]	0,0127
2018 – B	1	[1 ; 1]	0,0127
2338	1	[1 ; 1]	0,0127
2346	1	[1 ; 1]	0,0127
2362	1	[1 ; 1]	0,0127
2379	1	[1 ; 1]	0,0127
2380	1	[1 ; 1]	0,0127
2382	1	[1 ; 1]	0,0127
2384	1	[1 ; 1]	0,0127
2387	1	[1 ; 1]	0,0127
2397	1	[1 ; 1]	0,0127
2417	1	[1 ; 1]	0,0127
2418	1	[1 ; 1]	0,0127
5454	1	[1 ; 1]	0,0127
8820	1	[1 ; 1]	0,0127
Circuito	1	[1 ; 1]	0,0000

Tabella 39: Prova di Real-time PCR (gD)

ID Laboratorio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Kit estrazione	Protocollo di amplificazione
2018 – A	Pos. (25,7)	Neg.	Pos. (31,8)	Pos. (24,2)	Neg.	Pos. (34,1)	Pos. (25,6)	Neg.	Pos. (28,3)	Pos. (29,7)	2	F
2018 – B	Pos. (26,4)	Neg.	Pos. (32,6)	Pos. (27,1)	Neg.	Pos. (34,9)	Pos. (26,3)	Neg.	Pos. (29)	Pos. (30,4)	3	F
2346	Pos. (26,84)	Neg.	Pos. (31)	Pos. (25,60)	Neg.	Pos. (33,16)	Pos. (24,67)	Neg.	Pos. (27,96)	Pos. (30,19)	5	F
2418	Pos. (23,90)	Neg.	Pos. (29,95)	Pos. (24,22)	Neg.	Pos. (32,15)	Pos. (23,62)	Neg.	Pos. (26,93)	Pos. (28,92)	1	F
3232	Pos. (23,92)	Neg.	Pos. (29,12)	Pos. (24,07)	Neg.	Pos. (32,01)	Pos. (22,09)	Neg.	Pos. (25,34)	Pos. (27,50)	14	B-G
5454	Pos. (25,5)	Neg.	Pos. (31,3)	Pos. (26,1)	Neg.	Pos. (33,3)	Pos. (24,5)	Neg.	Pos. (28,4)	Pos. (30,3)	5	F
Risultati attesi dal CRNIBR	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.		

Tutti i laboratori hanno mostrato un **livello di concordanza ottima** ($\kappa=1$ [1-1]) e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso (Tabella 40).

Tabella 40: Risultati di riproducibilità di PCR Real time IBR con il metodo Wernike per il gD relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018 - A	1	[1 ; 1]	0,0008
2018 - B	1	[1 ; 1]	0,0008
2346	1	[1 ; 1]	0,0008
2418	1	[1 ; 1]	0,0008
3232	1	[1 ; 1]	0,0008
5454	1	[1 ; 1]	0,0008
Circuito	1	[1; 1]	0,0000

Tabella 41: Prova di Real-time PCR (gE)

ID Laboratorio	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Kit estrazione	Protocollo di amplificazione
2018 – A	Pos. (24,2)	Neg.	Pos. (29,8)	Pos. (24,6)	Neg.	Pos. (31,6)	Pos. (24,3)	Neg.	Pos. (26,7)	Pos. (28,1)	2	F
2018 - B	Pos. (25,4)	Neg.	Pos. (30,9)	Pos. (25,8)	Neg.	Pos. (32,7)	Pos. (25,5)	Neg.	Pos. (27,8)	Pos. (29,2)	3	F
2346	Pos. (22,49)	Neg.	Pos. (28,93)	Pos. (23,09)	Neg.	Pos. (31,09)	Pos. (22,36)	Neg.	Pos. (25,28)	Pos. (26,32)	5	F
3232	Pos. (27,22)	Neg.	Pos. (31,36)	Pos. (25,63)	Neg.	Pos. (33,49)	Pos. (24,20)	Pos. (40,71)	Pos. (27,74)	Pos. (29,61)	14	B-G
5454	Pos. (23,2)	Neg.	Pos. (28,4)	Pos. (23,7)	Neg.	Pos. (31,6)	Pos. (24,0)	Neg.	Pos. (25,6)	Pos. (27,2)	5	F
Risultati attesi dal CRNIBR	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos..	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.		

Di seguito sono riportati per ciascun laboratorio e per l'intero circuito gli indici di concordanza κ di Cohen e i relativi IC95% e p -value (Tabella 42). Fatta eccezione per il **laboratorio 3232**, che ha mostrato un livello di **concordanza buona ($\kappa=0,74$ [0,19-1])**, tutti gli altri laboratori hanno rivelato un livello di concordanza ottimo, con un alto livello di significatività, e conseguentemente anche l'intero circuito nel suo complesso ($\kappa=0,95$ [0,84-1]) dimostrando quindi un'elevata accuratezza.

Tabella 42: Risultati di riproducibilità di PCR Real time IBR con il metodo Wernike per il gE relativamente a ciascun laboratorio e all'intero circuito.

ID laboratorio	κ	IC95%	p-value
2018 -A	1	[1 ; 1]	0,0008
2018 - B	1	[1 ; 1]	0,0008
2346	1	[1 ; 1]	0,0008
3232	0,74	[0,19; 1]	0,0079
5454	1	[1 ; 1]	0,0008
Circuito	0,95	[0,84; 1]	0,0000

Tabella 43. Kit di estrazione e protocolli di PCR utilizzati dai diversi laboratori partecipanti

Identificativo progressivo	Kit di estrazione / Nome commerciale	Tipologia estrazione (Automatizzato/ Manuale)
1	MagMax™ Core Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystem)	Automatica
2	TaqMan™ Fast Advance Master Mix for qPCR (Applied Biosystem)	Automatica
3	TaqMan™ Fast Advance Master Mix for qPCR (Applied Biosystem)	Manuale
4	TaqMan™ Fast Virus 1 –step Master Mix for qPCR (Applied Biosystem)	Semiautomatica
5	QuantiTect® Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen)	Semiautomatica
6	VetMax™-plus qPCR Master Mix (Applied Biosystem)	Semiautomatica
7	Platinum™ quantitative PCR Supermix-UDG (Invitrogen)	Semiautomatica
8	AccurStart (Vazyme)	Automatica
9	TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Life Technologies)	Semiautomatica
10	Taq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad)	Automatica
11	TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Life Technologies)	Automatica
12	QuantiTect® Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen)	Manuale
13	Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs)	Automatica
14	ID Gene™ Mag Fast Extraxtion KIT (Innovative Diagnostics)	Automatica

Tabella 44. Protocollo di amplificazione

Identificativo progressivo	Riferimento bibliografico
A	De Giuli et al., 2002, <i>J Vet Diagn Invest</i> , 14, 353-356
B	WOAH Manual for Terrestrial Animals, 2024, Cap. 3.4.11, Parte B.1.3.
C	Zhang J. et al. 2022
D	Wang et al., (2007) <i>J Virol Methods</i> , 144, 103-108
E	Manna et al., (2007). Atti del IX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., pp. 37-38
F	Wernike et al., 2011 <i>J Virol Methods</i> , 174, 77-84
G	In-house Triplex qPCR gD/gE/Actin

5. Discussione e conclusioni

La partecipazione ai circuiti interlaboratorio rappresenta un pilastro del sistema di assicurazione della qualità nel quale operano i laboratori afferenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. L'organizzazione dei circuiti interlaboratorio rientra inoltre tra i compiti istituzionali del Centro di Referenza Nazionale per la Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR) con l'obiettivo di valutare le performance diagnostiche dei laboratori partecipanti.

Il CNRIBR ha inserito nel circuito interlaboratorio le diverse applicazioni diagnostiche sia in termini di prove diagnostiche indirette e dirette (ELISA Ac totali, ELISA gB, ELISA gE, Virus neutralizzazione, End-point PCR, Real-time PCR gB, Real-time PCR gE, Real-time PCR gD) sia in termini di matrici (siero, latte, omogenati d'organo) e tale impostazione ha trovato larga condivisione tra i laboratori interessati.

La Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR) è infatti, una malattia infettiva che può pesantemente condizionare sia l'allevamento bovino da latte sia quello da carne e suscita quindi, l'attenzione degli allevatori e dei veterinari pratici che richiedono risposte diagnostiche pronte ed affidabili ai laboratori. Inoltre l'IBR ha un interesse fondamentale per gli animali destinati ai Centri Genetici e alla produzione di materiale germinale (sperma, embrioni e ovociti). La rinotracheite infettiva del bovino viene anche controllata negli animali introdotti in mostre e fiere. Infine riveste un ruolo importante negli scambi commerciali tra Paesi europei ed Paesi terzi.

È opportuno sottolineare il clima di grande collaborazione che si è creato con i referenti iscritti al circuito. Le comunicazioni si sono svolte in forma puntuale ed ogni dettaglio è stato affrontato con cura ed efficienza. In particolare, l'applicativo WEB disponibile nel sito dell'IZSUM (<http://view.izsum.it/ringtest/index.php>) ha permesso di gestire le iscrizioni e la trasmissione dei risultati delle prove di laboratorio.

A questa edizione hanno partecipato 44 laboratori: 42 italiani, un laboratorio tedesco (WOAH and National Reference Laboratory for Bovine Herpesvirus type 1 infection - Germany, Friedrich-Loeffler-Institut, FLI, Greifswald, Insel Riems, Germany) e un laboratorio francese (National Reference Laboratory, NRL, for IBR, Laboratory Ploufragan-Plouzané-Niort, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, ANSES, France). I laboratori esteri hanno partecipato al Ring Test nell'ambito dell'armonizzazione delle procedure diagnostiche a livello europeo implicite nel progetto di ricerca DISCONTTools (Consorzio internazionale di ricerca STAR-IDIAZ).

Gli esiti di laboratorio ottenuti per la prova **ELISA Ac totali nel siero** hanno evidenziato, da parte di ciascun laboratorio una concordanza ottima ($k=1$), ad eccezione di un laboratorio (Id. 2342) che ha mostrato una concordanza "Moderata" ($k=0,60$). Complessivamente, la concordanza evidenziata è risultata ottima ($K=0,96$; Tabella 20).

Per quanto riguarda il rilievo degli anticorpi **anti-glicoproteina B (gB) nel siero**, la concordanza dei singoli laboratori e quella complessiva ha mostrato valori ottimi ($k=1$; Tabella 22).

In merito alla **prova di virus neutralizzazione** bisogna evidenziare che tutti i laboratori partecipanti hanno correttamente identificato la tipologia dei campioni (positivi, negativi), pur se con differenze nei titoli espressi (± 2 Log). Il coefficiente di variabilità (CV) osservato ha mostrato valori da 8,3% (siero n. 2) a 21,6% (siero n.6) con una media dell'11,7%. Lo z-score ha mostrato p -value variabili da 0,0537 (siero n. 4) a 0,6663 (siero n.7), indicando che per ciascun siero, non sono emerse differenze statisticamente significativa tra il titolo espresso dai laboratori partecipanti e quello atteso dal CRNIBR (Tabella 24; Figura 1; Figura 2).

Relativamente al rilievo degli anticorpi **anti-glicoproteina E (gE) nel siero**, la concordanza di ciascun laboratorio e quella complessiva è risultata ottimale ($k=1$; Tabella 26).

In merito alla matrice latte, i **tests ELISA Ac totali, ELISA anticorpi anti-glicoproteina B (gB) e anticorpi anti-glicoproteina E (gE)**, hanno mostrato una concordanza ottima ($k=1$), sia tra i singoli laboratori sia complessiva (Tabella 28; Tabella 30; Tabella 32).

Tutti i laboratori partecipanti alla prova di **End-point PCR** e alla prova di **Real-time PCR gB**, hanno mostrato una concordanza ottima ($k=1$) tra ciascun laboratorio e quella complessiva (Tabella 34; Tabella 36).

Diversamente per quanto riguarda la prova di **Real-time PCR gE**, tutti i laboratori hanno mostrato una concordanza ottima ($k=1$), ad eccezione di un laboratorio (Id. 3232), che ha evidenziato una concordanza "Buona" ($k=0,74$). Complessivamente la concordanza evidenziata è stata ottima ($k=0,95$; Tabella 40).

Analizzando complessivamente i risultati ottenuti, le criticità accertate in questo Ring Test riguardano essenzialmente le prove ELISA Ac totali da siero e la prova di Real-time PCR gE da omogenato d'organo, in quanto due laboratori hanno ottenuto rispettivamente un livello di concordanza "Moderata" e "Buona".

Questi aspetti sono di fondamentale importanza per la diagnosi di IBR e per questo motivo sarà oggetto di un'attenta valutazione.

In conclusione, si esprime generale soddisfazione sia per la partecipazione al Ring Test sia per le elevate *performances* evidenziate. Le deviazioni dall'atteso, accertate nelle diverse prove, saranno valutate insieme ai singoli laboratori per verificarne le cause e mettere in atto le eventuali azioni correttive.

6. Ringraziamenti

È doveroso ringraziare tutti i colleghi che hanno partecipato al circuito interlaboratorio, il personale dell'Unità Operativa Complessa Officina Farmaceutica per il supporto fornito nella liofilizzazione e confezionamento dei campioni, l'Osservatorio Epidemiologico per l'elaborazione statistica ed i colleghi dell'Unità Operativa Gestione Servizi informatici per la gestione dell'applicativo WEB utilizzato per l'iscrizione, la corrispondenza e il ricevimento dei risultati ottenuti da parte dei singoli laboratori.