





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
Umbria e Marche

Convegno

**Malattie da Retrovirus
sottoposte a sorveglianza:
aggiornamenti epidemiologici e
strumenti diagnostici**

**Perché tanto rumore intorno ai
RING TEST?**



IZS Umbria Marche

**Perché tanto rumore intorno ai
RING TEST?**

SORVEGLIANZA

**CONTROLLO
TERRITORIO**



**SISTEMA
DIAGNOSTICO**

**SISTEMA
DIAGNOSTICO**

=

**TEST
LABORATORIO**

**Punto critico:
affidabilità dei test diagnostici**



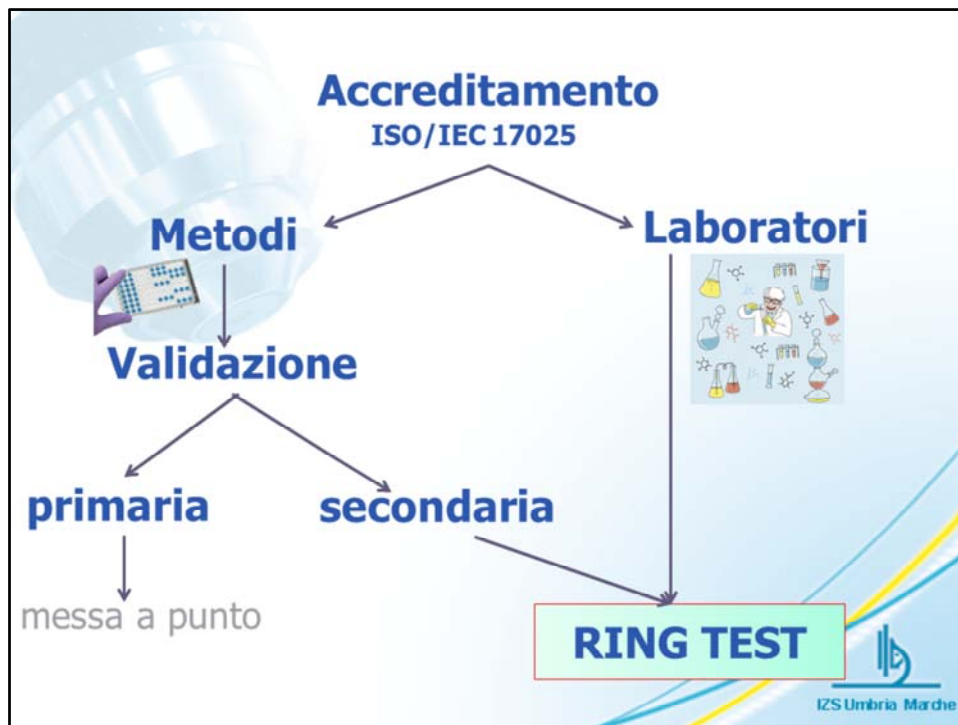
affidabilità dei test diagnostici



**IMPARO COSI' BENE
DAI MIEI ERRORI...
CHE OGNI
GIORNO
MI RIESCONO
MEGLIO!**



ACCREDIA
L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO





RING TEST 1

- Organizzato da un CENTRO DI REFERENZA
- Utile per VERIFICARE le performances
- Utile per STANDARDIZZARE le performances

LINEE GUIDA ISO/IEC 17043: 2010

RING TEST 2

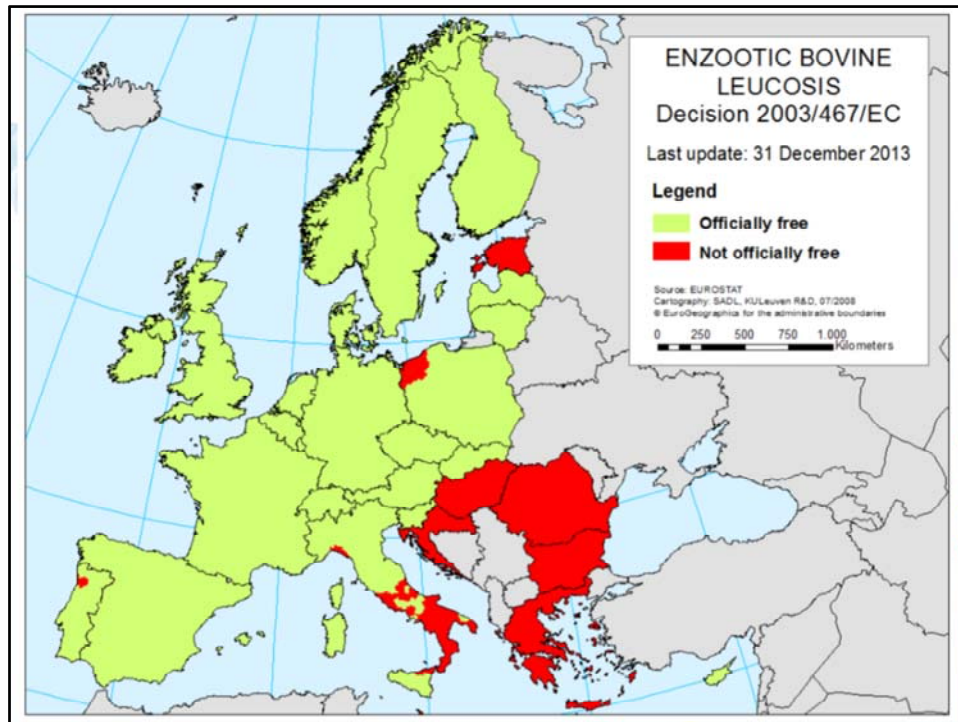
- È comprensibile
- Prevede un REPORT
- Aiuta il laboratorio in caso di NON CONFORMITÀ
- È ADERENTE ALLA REALTÀ



Piani di eradicazione / sorveglianza per Leucosi Bovina Enzoetica:

HANNO ANCORA SENSO??





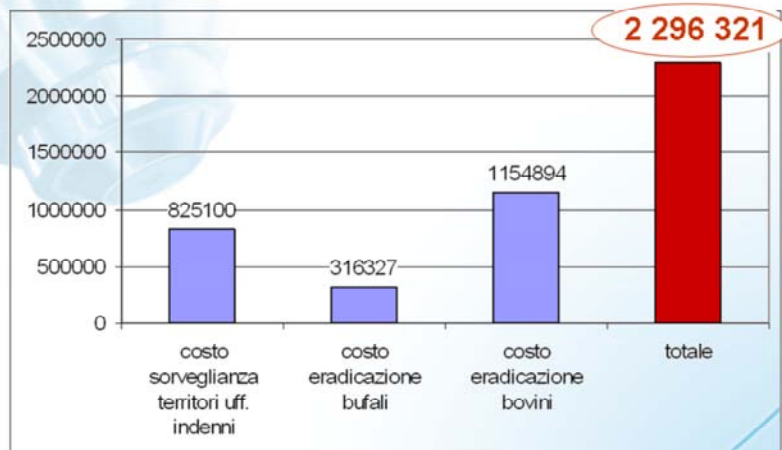
LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

DECISIONE DI ESECUZIONE
DELLA COMMISSIONE
del 14 febbraio 2014

-  Territori indenni
-  Territori non indenni



LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA



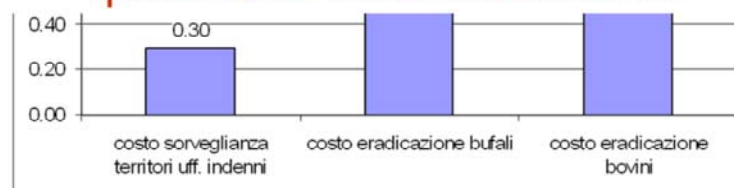
Costi documentati relativi ai piani di sorveglianza e/o eradicazione

LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA



1 300 000 €

**di risparmio in caso di raggiungimento della
qualifica di stato indenne !!!**



LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

- Metodi diagnostici

- AGID
- ELISA

} Sierologici

- PCR - REAL TIME
- Istologico

} Diagnosi differenziale

- Non è disponibile un Gold Standard

ALLEGATO

Il capitolo II dell'allegato D della direttiva 64/432/CEE è sostituito dal testo seguente:

-CAPITOLO II

ESAMI PER LA RICERCA DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

In caso di contestazione debitamente motivata dei risultati degli esami, si effettua un controllo complementare mediante un esame di immunodiffusione.

OIE Reference Laboratory for Enzootic Bovine Leukosis (EBL)
Südufer 10
17493 Greifswald — Insel Riems
GERMANIA.

A. Reazione di immunodiffusione su gel di agar per la leucosi bovina enzootica

1. L'antigene da impiegare nella prova deve contenere glicoproteina del virus della leucosi bovina. L'antigene deve essere standardizzato rispetto al siero E05.

Obiettivi RING TEST LEB

1. Standardizzazione delle metodiche
2. Verifica delle performances (kit commerciali)
3. Mantenimento qualifica operatori

Partecipanti



> 90 laboratori

> 9000 determinazioni analitiche



Pannello matrice SIERO AGID - ELISA

Identificativo campione	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Composizione campione	NEGATIVO A	NEGATIVO B	POSITIVO standard 1/100	POSITIVO di campo	NEGATIVO C
Identificativo campione	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
Composizione campione	NEGATIVO D	POSITIVO standard 1/50	POSITIVO di campo	NEGATIVO E	NEGATIVO F
Identificativo campione	Campione 11	Campione 12	Campione 13	Campione 14	Campione 15
Composizione campione	POSITIVO standard 1/10	POSITIVO di campo	NEGATIVO G	NEGATIVO H	NEGATIVO I

- 3 diluizioni siero di riferimento internazionale (pool di siero)
- 3 positivi di campo
- 9 sieri negativi

Pannello matrice SIERO AGID - ELISA

Identificativo campione	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Composizione campione	NEGATIVO A	NEGATIVO B	POSITIVO standard 1/100	POSITIVO di campo	NEGATIVO C
Identificativo campione	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
Composizione campione	NEGATIVO D	POSITIVO standard 1/50	POSITIVO di campo	NEGATIVO E	NEGATIVO F
Identificativo campione	Campione 11	Campione 12	Campione 13	Campione 14	Campione 15
Composizione campione	POSITIVO standard 1/10	POSITIVO di campo	NEGATIVO G	NEGATIVO H	NEGATIVO I

- 3 diluizioni siero di riferimento internazionale (pool di siero)
- 3 positivi di campo
- 9 sieri negativi

Pannello matrice SIERO AGID - ELISA

Identificativo campione	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Composizione campione	NEGATIVO A	NEGATIVO B	POSITIVO standard 1/100	POSITIVO di campo	NEGATIVO C
Identificativo campione	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
Composizione campione	NEGATIVO D	POSITIVO standard 1/50	POSITIVO di campo	NEGATIVO E	NEGATIVO F
Identificativo campione	Campione 11	Campione 12	Campione 13	Campione 14	Campione 15
Composizione campione	POSITIVO standard 1/10	POSITIVO di campo	NEGATIVO G	NEGATIVO H	NEGATIVO I

- 3 diluizioni siero di riferimento internazionale (pool di siero)
- 3 positivi di campo
- 9 sieri negativi

Pannello matrice LATTE

Identificativo campione	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Composizione campione	NEGATIVO A	POSITIVO di campo 1/20	NEGATIVO B	POSITIVO standard 1/250	NEGATIVO C
Identificativo campione	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
Composizione campione	POSITIVO di campo 1/40	NEGATIVO D	POSITIVO standard 1/2500	NEGATIVO E	POSITIVO di campo 1/80
Identificativo campione	Campione 11	Campione 12	Campione 13	Campione 14	Campione 15
Composizione campione	NEGATIVO F	POSITIVO standard 1/12500	NEGATIVO G	POSITIVO di campo 1/160	POSITIVO standard 1/25000

- 4 diluizioni siero di riferimento internazionale (latte di massa)
- 3 positivi di campo
- 7 campioni negativi

Pannello matrice LATTE

Identificativo campione	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Composizione campione	NEGATIVO A	POSITIVO di campo 1/20	NEGATIVO B	POSITIVO standard 1/250	NEGATIVO C
Identificativo campione	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
Composizione campione	POSITIVO di campo 1/40	NEGATIVO D	POSITIVO standard 1/2500	NEGATIVO E	POSITIVO di campo 1/80
Identificativo campione	Campione 11	Campione 12	Campione 13	Campione 14	Campione 15
Composizione campione	NEGATIVO F	POSITIVO standard 1/12500	NEGATIVO G	POSITIVO di campo 1/160	POSITIVO standard 1/25000

- 4 diluizioni siero di riferimento internazionale (latte di massa)
- 3 positivi di campo
- 7 campioni negativi

Pannello matrice LATTE

Identificativo campione	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Composizione campione	NEGATIVO A	POSITIVO di campo 1/20	NEGATIVO B	POSITIVO standard 1/250	NEGATIVO C
Identificativo campione	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
Composizione campione	POSITIVO di campo 1/40	NEGATIVO D	POSITIVO standard 1/2500	NEGATIVO E	POSITIVO di campo 1/80
Identificativo campione	Campione 11	Campione 12	Campione 13	Campione 14	Campione 15
Composizione campione	NEGATIVO F	POSITIVO standard 1/12500	NEGATIVO G	POSITIVO di campo 1/160	POSITIVO standard 1/25000

- 4 diluizioni siero di riferimento internazionale (latte di massa)
- 3 positivi di campo
- 7 campioni negativi

Risultati matrice SIERO

Elisa siero	partecipanti	% corretti	% + corretti	% - corretti	dubbi
Home Made	5	99,7	100	99,6	0
ID vet	22	100	100	100	0
IDEXX	15	100	100	100	0
Symbiotics	12	99,7	100	99,5	4

AGID		% CORRETTI		
PRODUTTORE ANTIGENE	PARTECIPANTI	TOTALE	POSITIVI	NEGATIVI
IZS 1	13	95,9	89,7	100
IZS 2	22	92,1	80,3	100
TOTALE	35	93,5	83,8	100



Risultati matrice LATTE

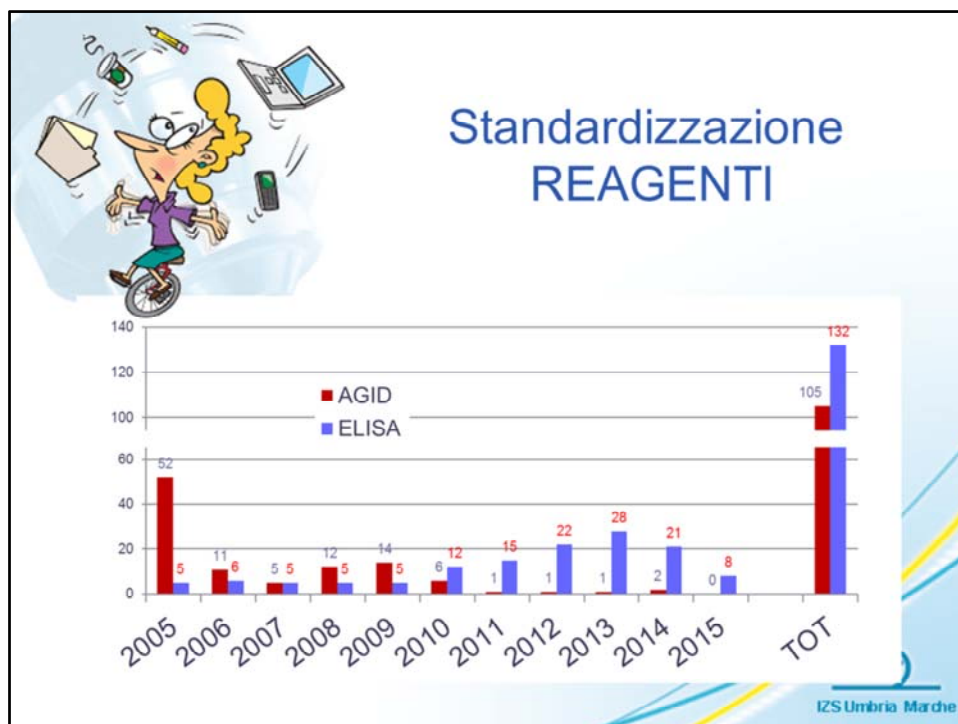


	totale	Negativo	accordance
HOME MADE	94,8	100	94,1
IDEXX	99,4	100	96,4
TOTALE	98,6	100	95,9

	SS 1/250	SS 1/2500	SS 1/12500	SS 1/25000
FATTORE DILUIZIONE	SINGOLO	10	50	100
HOME MADE	100	100	100	44,4
IDEXX	100	100	100	92,3
TOTALE	100	100	100	83,3

	latte 1/20	latte 1/40	latte 1/80
HOME MADE	100	100	100
IDEXX	100	100	100
TOTALE	100	100	100

IZS Umbria Marche





Validazione matrice LATTE



Diluizione siero E5 in latte di massa	N. di soggetti che possono contribuire al pool	IDEXX VERIFICATION LOTTO 4095	IDEXX SCREENING LOTTO 3197	IDVET LOTTO 483	SYNBIOTICS LOTTO 13LBLV328
1:250	1	POS	POS	POS	POS
1:2500	10	POS	POS	POS	POS
1:12500	50	POS	POS	neg	POS
1:25000	100	POS	DUBBIO	neg	POS
1:37500	150	POS	neg	neg	neg
1:50000	200	POS	neg	neg	neg
1:62500	250	POS	neg	neg	neg
1:75000	300	DUBBIO	neg	neg	neg
1:87500	350	DUBBIO	neg	neg	neg
1:100000	400	neg	neg	neg	neg
1:112500	450	neg	neg	neg	neg
1:125000	500	neg	neg	neg	neg



IZS Umbria Marche



Validazione matrice LATTE



DILUIZIONE LATTE POSITIVO	IDEXX VERIFICATION LOTTO 4095	IDEXX SCREENING LOTTO 3197	IDVET LOTTO 483	SYNBIOTICS LOTTO 13LBLV328
1:10	POS	POS	POS	POS
1:50	POS	POS	POS	POS
1:100	POS	POS	POS	POS
1:150	POS	POS	POS	POS
1:200	POS	POS	POS	POS
1:250	POS	POS	POS	POS
1:300	POS	POS	neg	POS
1:350	POS	POS	neg	POS
1:400	POS	POS	neg	POS
1:450	POS	POS	Neg	POS
1:500	POS	POS	Neg	POS



Problematiche di campo



AGID

- Tempo di esecuzione della prova: 72 h
- Scarsa sensibilità: FALSI NEGATIVI

ELISA

- Risultato dubbio
- Risultato falso positivo (?)

Conferme
CEREL

DIAGNOSI	CONFERME +	NON CONFERME
275	134	141



**VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DEL SISTEMA
DIAGNOSTICO NEI CONFRONTI DELLA LEB
IZS DELLA PUGLIA E DELLA BASILICATA**

Provincia	PERIODO 2012/4		
	CAMPIONI Esaminati	Falsi positivi	%
BR	6.793	0	0
FG	65.675	8	0,012
LE	7.431	0	0
MT	39.622	4	0,010
BA	101.183	1	0,001
PZ	85.615	32	0,037
TA	70.634	17	0,024
TOT.	376.953	62	0,016

Si ringrazia il dr. SANTAGATA e tutti i colleghi dell'IZS Puglia e Basilicata

**VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DEL SISTEMA DIAGNOSTICO
NEI CONFRONTI DELLA LEB NEI LABORATORI DELL'IZS DELLA
PUGLIA E DELLA BASILICATA**

Test screening	capi		
		infetti	non infetti
			Σ
	Test +	10	62
	Test -	0	376881
	Σ	10	376943
			376953

Sensibilità	= 100.00 %	95% CI: 68.97 % to 100.00 %
Specificità	= 99.98 %	95% CI: 99.98 % to 99.99 %
Val. predittivo positivo	= 13.89 %	95% CI: 6.88 % to 24.07 %
Val. predittivo negativo	= 100.00 %	95% CI: 100.00 % to 100.00 %

CONCLUSIONI



- Il sistema diagnostico nazionale è adeguato ed efficiente
- I laboratori preposti sono in linea con la normativa
- I test utilizzati sono standardizzati

CONCLUSIONI



- Livello strategico scarso
- Non tutti i laboratori hanno implementato la tecnica ELISA
- Permangono motivi di persistenza dell'infezione

