

VALIDAZIONE PRELIMINARE DI UN ELISA COMPETITIVA IN FASE SOLIDA PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELLA WEST NILE DISEASE (WNDV) IN SIERI EQUINI

Nardini R.^{*[1]}, Autorino G.^[1], Caprioli A.^[1], De Simone F.^[2], Frontoso R.^[1], Lelli D.^[2], Rosone F.^[1], Scicluna M.T.^[1]

Keywords: West Nile Disease, Competitive ELISA, Validation

^[1]Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini ~ Roma,

^[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna ~ Brescia

SUMMARY: Data on a preliminary validation of a solid phase competitive ELISA for detection of antibodies against WNDV are presented and discussed. An interlaboratory trial was carried out in which nine laboratories were involved in validating the assay using a panel of forty sera analysed in three separate runs. The parameters evaluated were diagnostic sensitivity (Dse) and specificity (Dsp), Cohen K, weighted Cohen K, coefficient of variation (CV), accordance, concordance and concordance odds ratio (COR). Analysis of these parameters indicates that this assay is suitable for screening purposes, although performances on field sera still have to be investigated.

INTRODUZIONE: In Italia, il primo focolaio di West Nile Disease (WND) risale al 1998. Dal 2001 è stato adottato un piano di sorveglianza nazionale che, nelle aree considerate a rischio di introduzione di WND, prevede anche la sorveglianza sierologica su equini e polli sentinella. Come test di screening per i sieri equini, si utilizzano delle ELISA commerciali, disponibili sia per la ricerca degli immunoglobuline di classe G che M, quest'ultimo indice di infezione recente. I campioni positivi sono confermati con il test di riduzione delle placche. Una ELISA competitiva in fase solida è stata sviluppata e parzialmente validata attraverso un circuito interlaboratorio. In questo lavoro sono presentati e discussi i dati sulla validazione preliminare.

MATERIALI E METODI: Nella validazione sono stati coinvolti nove laboratori appartenenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Ad ogni laboratorio partecipante sono state fornite le piastre preadsorbite, i reagenti immunologici, anticorpo monoclonale (Mab) e antigene, ed il pannello di sieri da esaminare. Il pannello era formato da 20 sieri, ciascuno in doppio, e numerati da 1 a 40. L'ordine dei sieri era differente per ogni laboratorio. Il pannello era costituito da sieri di cinque cavalli di cui due soggetti positivi per infezione naturale, due vaccinati con il vaccino spento "West Nile-Innovator" della Fort Dodge Laboratories (USA), e un controllo negativo. Per la costituzione del pannello, i sieri positivi sono stati utilizzati a varie diluizioni. A ciascun laboratorio è stato richiesto di eseguire tre prove differenti, per operatore o giorno di esecuzione. La procedura del test è la seguente:

- aggiunta di antigene (virus inattivato da criolisato di colture cellulari) su piastre preadsorbite con un Mab contro il dominio Ed III del WNDV;
- incubazione per 90 minuti a 37°C;
- in parallelo alla prima incubazione, i campioni di siero ed i controlli sono diluiti 1:5 e 1:10 in un tampone di diluizione su un'altra piastra;
- campioni e controlli (siero positivo, siero negativo e controllo della reattività dell'antigene) sono quindi trasferiti sulla piastra preadsorbite;
- incubazione per 60 minuti a 37°C;
- 3 cicli di lavaggio con PBS con 0,05% di Tween 20;

- aggiunta dello stesso Mab utilizzato per l'adsorbimento, coniugato con HRPO;
- incubazione per 90 minuti a 37°C;
- aggiunta di substrato (OPD);
- incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti al buio;
- aggiunta di acido solforico per arrestare la reazione enzimatica;
- lettura della densità ottica (DO) ad una lunghezza d'onda di 492nm.

I criteri di validazione della prova sono: media DO del controllo della reattività dell'antigene maggiore di 1,0; DO del controllo negativo < 50% della DO del controllo della reattività dell'antigene in entrambe le diluizioni; DO del controllo positivo > 50% del DO del controllo della reattività dell'antigene in entrambe le diluizioni. I risultati sono stati inviati al Centro di Referenza per le Malattie degli Equini per l'elaborazione.

Le prove che non rispettavano i criteri di validazione del kit sono state escluse. I sieri sono stati categorizzati come negativo, debolmente positivo, mediamente positivo e fortemente positivo secondo il valore di percentuale di inibizione (PI), calcolata come la differenza tra 100 e il rapporto percentuale tra DO del campione e DO media del controllo antigene.

La validazione è stata eseguita seguendo le linee guida del Manuale WOAH.

Sono stati stimati i seguenti parametri:

Accuratezza qualitativa, stimata attraverso:

- DSe e DSp;
- K di Cohen e K pesato di Cohen per ogni laboratorio, K multiplo di Cohen per tutti i laboratori.

Per la stima del K di Cohen e del K pesato, i risultati attesi sono stati confrontati con quelli ottenuti.

Considerando sia le caratteristiche qualitative che semi-quantitative del test ELISA, ripetibilità e riproducibilità sono state stimate utilizzando i seguenti parametri:

- CV delle PI dei soli sieri positivi, in quanto i negativi, per la natura competitiva della prova, avrebbero mostrato un CV non valutabile;
- Accordanza: è l'equivalente qualitativo della ripetibilità ed è definita come la probabilità che un campione, analizzato in doppio, in condizioni di ripetibilità, dia lo stesso risultato qualitativo indipendentemente dal risultato atteso. Riassumendo brevemente il metodo utilizzato, si può definire l'accordanza come il rapporto percentuale tra: il numero di risultati per ciascun siero in esame che, appaiati con gli altri risultati ottenuti dallo stesso laboratorio per quel siero, danno lo stesso risultato, e il numero totale di coppie possibili. Dato un numero n di risultati disponibili per ogni siero possiamo calcolare il numero di possibili accoppiamenti con la sottostante formula dove C= numero di combinazioni possibili, n= numero di risultati e k= numero di risultati per ogni combinazione.
- Concordanza: è, per i dati qualitativi, l'equivalente della riproducibilità ed è definita come la probabilità che lo stesso cam-

pione, inviato a due o più laboratori, dia lo stesso risultato. Si può calcolare accoppiando ciascun risultato per un determinato siero con tutti i risultati, per quel siero, ottenuti dagli altri laboratori.

· COR. Possiamo stimare ulteriormente la variabilità tra i laboratori confrontando i valori di accordanza e concordanza. Logicamente, se la concordanza è minore dell'accordanza si può dedurre che vi sia una variabilità interlaboratorio maggiore di quella intralaboratorio, cioè, che un campione analizzato all'interno dello stesso laboratorio ha più probabilità di dare lo stesso risultato rispetto a quando viene analizzato in laboratori diversi. Visto che sia la concordanza che l'accordanza sono for-

temente dipendenti dalla sensibilità (che comunque nel nostro caso è risultata essere pari al 100%), è utile calcolare il COR, meno influenzato dal livello di sensibilità. Il valore di COR può essere interpretato come la probabilità relativa di ottenere lo stesso risultato quando un campione analizzato nello stesso laboratorio rispetto a quando è analizzato in laboratori diversi. Il valore ottimale di COR dovrebbe essere più vicino possibile ad 1. Valori > o < di 1 indicano rispettivamente una maggiore o minore variabilità interlaboratorio rispetto alla intralaboratorio.

Per maggiori dettagli riguardanti il calcolo di questi parametri si rimanda agli articoli di Langton et al., Quatto and Soliani et al. (1,2,3).

$$C = \frac{n(n-1)(n-2)\dots(n-k+1)}{n!}$$

Formula per il calcolo del numero di combinazioni di n risultati

- RISULTATI E CONCLUSIONI:** 1. Sia la Dse che la Dsp sono risultate pari al 100% per cui il test è accurato.
 2. Il K multiplo è risultato pari a 0,76. Il valore di K per tutti i laboratori, confrontati tra loro, è risultato pari a 0,72. I valori di K indicano un grado di concordanza quasi perfetto secondo la classificazione di Landis et al. (4). Nel Grafico 1 sono mostrati i valori di K a 2 e di K pesato a 4 categorie, confrontati con l'atteso, per ogni laboratorio.
 3. I valori di CV delle PI sono risultati inferiori al 20% (Grafico 2).
 4. I valori di accordanza, concordanza e COR sono mostrati in Tabella 1.
 Anche la ripetibilità e la riproducibilità risultano essere soddisfacenti in quanto i valori di CV sono inferiori al 20%, valore stabilito come limite di accettabilità; inoltre, accordanza e concordanza sono risultate prossime al 100% in più della metà dei sieri. Il COR è risultato prossimo ad 1 per tutti i sieri, eccetto per due di essi, per i quali comunque non ha superato 2,53, valore ritenuto accettabile.
 In base ai parametri valutati questo test è adatto per essere utilizzato in fase di screening. Per soddisfare completamente i criteri del WOAHA è necessario completare la seconda fase di validazione attraverso il controllo di altri parametri, primo dei quali le performances diagnostiche del test su sieri di campo disponibili dalla sorveglianza degli ultimi anni.

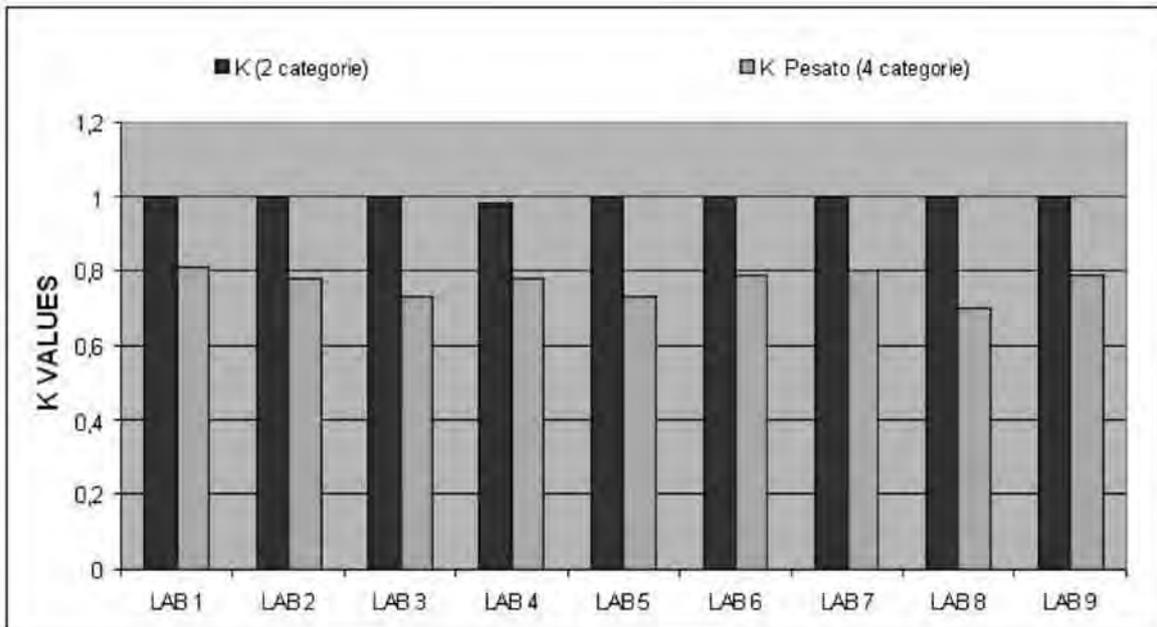


Grafico 1: Valori di K a 2 categorie e di K pesato a 4 categorie per ogni laboratorio

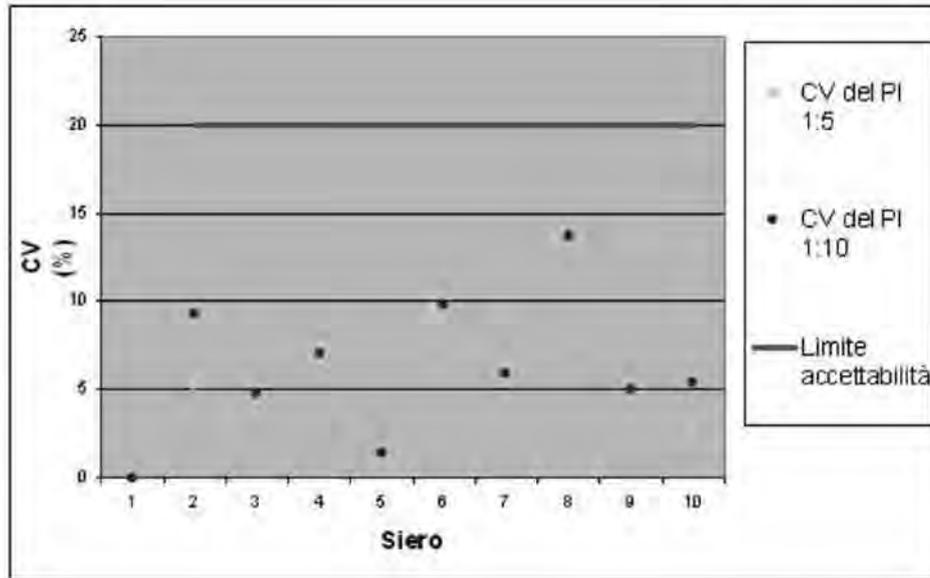


Grafico 2: Coefficiente di variazione delle PI dei sieri positivi

SIERO N°	Accordanza	Concordanza	COR	SIERO N°	Accordanza	Concordanza	COR
1	86,7	81,7	1,46	11	62,1	45,1	2
2	95,3	95,2	1,01	12	75,4	74,9	1
3	92,4	90,5	1,3	13	64	41,3	2,5
4	100	100	1	14	66,9	52,8	1,8
5	76,3	56,9	2,4	15	100	100	1
6	95,3	95,2	1	16	100	100	1
7	65,9	49,7	1,9	17	100	100	1
8	86,7	81,7	1,5	18	100	100	1
9	100	100	1	19	100	100	1
10	100	100	1	20	100	100	1

Tabella 1: Valori di accordanza, concordanza e COR per ogni siero

BIBLIOGRAFIA:

1.S.D. Langton et al; 2002; "Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance", *International Journal of Food Microbiology*; 79 175-181
 2. <http://www.dsa.unipr.it/soliani/soliani.html>

3.P. Quatto; 2004; "Un test di concordanza tra più esaminatori"; *Statistica*; 64; 1;145-151
 4.J. Richard Landis e Gary G. Koch; 1977 "The measurement of observer agreement for categorical data" *Biometrics*; 33;159-174.