



Centro di Referenza Nazionale
per le Malattie degli Equini

CIRCUITO INTERLABORATORIO
ARTERITE VIRALE EQUINA

Tecnica colture cellulari

Anno 2018

REPORT

ENTE ORGANIZZATORE: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA TOSCANA “M. ALEANDRI”

Centro Referenza Nazionale Malattie degli equini (CeRME)

Responsabile: Maria Teresa Scicluna

E-mail: teresa.scicluna@izslt.it

Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma

Tel. +39 06 79099353 Fax: +39 06 79340724

E-mail: cerme@izslt.it

GRUPPO DI LAVORO:

Gian Luca Autorino, email: gianluca.autorino@izslt.it

Marina Cittadini, email: marina.cittadini@izslt.it

Stefania Sittinieri, email: stefania.sittinieri@izslt.it

Giampiero Dante, email: giampiero.dante@izslt.it

Giusy Cardeti, email: giusy.cardeti@izslt.it

Roberto Nardini, email: roberto.nardini@izslt.it

Maria Teresa Scicluna, email: teresa.scicluna@izslt.it

Indice generale

SCOPO DEL CIRCUITO.....	4
DESCRIZIONE DEL CIRCUITO	4
Preparazione e distribuzione dei campioni.....	5
Controllo di qualità.....	6
Test di omogeneità	6
Test di stabilità	6
Esecuzione delle prove ed invio dei risultati	7
Valutazione statistica dei risultati	8
Valutazione dell'accuratezza per ogni laboratorio.....	8
Criteri di valutazione.....	9
Valutazione dell'accuratezza complessiva.....	9
RISULTATI	9
Valutazione dell'esecuzione delle prove	9
Sensibilità, specificità e concordanza	10
Valutazione dell'accuratezza complessiva	11
Valutazione della tossicità cellulare dei campioni	12
DISCUSSIONE	13
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	15

SCOPO DEL CIRCUITO

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri" è stato nominato Centro di Referenza nazionale per le Malattie degli Equini (CeRME) con D.M. 4 ottobre 1999.

Nell'adempimento dei compiti assegnati ai Centri di Referenza, viene organizzato un circuito di prove interlaboratorio (CI) per la diagnosi virologica di Arterite Virale Equina (AVE) mediante inoculo di colture cellulari (CC).

Lo scopo del circuito è quello di monitorare i livelli di competenza tecnica dei laboratori che effettuano diagnosi virologica di AVE mediante inoculo di CC.

Il presente documento ha lo scopo di illustrare le modalità di organizzazione del circuito e di preparazione dei campioni, nonché i risultati e i criteri di valutazione delle prestazioni dei laboratori partecipanti conformemente alle linee guida internazionali [1, 2 e 3].

DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

L'adesione dei laboratori al Circuito è stata formalizzata tramite e-mail al CeRME.

Al fine di garantire la riservatezza, ad ogni laboratorio è stato assegnato un codice univoco di identificazione (tabella 1), comunicato via e-mail contestualmente all'invio dei campioni. Tale codice viene usato per tutti gli scambi di informazioni tra il CeRME e i laboratori partecipanti al CI.

I dati, trattati in forma riservata, sono stati utilizzati dal CeRME per l'analisi e la valutazione dei risultati.

I risultati saranno messi a disposizione del Ministero della Salute e, se richiesti, ad enti terzi autorizzati, previa informazione per iscritto ai partecipanti al circuito.

La relazione finale riportante i risultati e la valutazione del CI sarà pubblicata, in formato anonimo, sul sito del CeRME.

Preparazione e distribuzione dei campioni

Il pannello da esaminare era composto da tre campioni liquidi seminali equini positivi e due negativi in CC per AVE. I campioni disponibili presso il CeRME sono stati sottoposti a prove per l'isolamento del virus.

I campioni sono stati aliquotati e il risultato qualitativo è stato ottenuto nelle prove preliminari. Successivamente, le aliquote sono state sottoposte alle prove di controllo qualità di omogeneità e di stabilità (vedi paragrafo successivo).

Il CeRME ha comunicato anticipatamente per e-mail, l'invio dei campioni tramite corriere.

A ciascun laboratorio sono stati inviati due pannelli accompagnati dalla “Scheda invio pannello Liquidi seminali CI AVE CC 2018”.

Ogni pannello era costituito da 5 campioni, contenenti 300 µl di liquido seminale già sonicato e centrifugato. Ogni campione era stato identificato progressivamente con un codice alfanumerico composto da una lettera che identifica il laboratorio e un numero riferito all'aliquota (tabella 1).

L'aliquota del secondo pannello identificata con lo stesso codice della rispettiva aliquota del primo pannello, andava utilizzata in caso di ripetizione della prova.

La temperatura di conservazione dei due pannelli di liquidi seminali fino all'esecuzione dell'analisi, doveva essere di $(- 80 \pm 10) ^\circ\text{C}$.

LABORATORI	CODIFICA CAMPIONI									
IDENTIFICATIVO	1		2		3		4		5	
A	A9	A9	A7	A7	A8	A8	A3	A3	A6	A6
C	C19	C19	C11	C11	C15	C15	C14	C14	C13	C13
D	D28	D28	D25	D25	D23	D23	D21	D21	D27	D27
E	E37	E37	E36	E36	E34	E34	E33	E33	E39	E39
F	F45	F45	F48	F48	F42	F42	F46	F46	F43	F43
G	G51	G51	G57	G57	G55	G55	G60	G60	G54	G54
H	H65	H65	H68	H68	H66	H66	H67	H67	H63	H63
I	I80	I80	I72	I72	I78	I78	I76	I76	I77	I77
L	L87	L87	L82	L82	L84	L84	L85	L85	L81	L81

Tabella 1: Codifica alfanumerica dei campioni per ciascun laboratorio

Ai partecipanti è stato richiesto di restituire entro 7 giorni dal ricevimento del pannello il “Modulo ricezione campioni CI AVE CC 2018” allegato, per e-mail a cerme@izslt.it, segnalando eventuali problematiche riferibili al trasporto. Lo stesso modulo è stato utilizzato in caso di mancato ricevimento dei campioni nei tempi indicati, sempre inviato per e-mail.

Controllo di qualità

Test di omogeneità:

Cinque pannelli sono stati esaminati per AVE in CC al fine di verificare l'omogeneità dei risultati.

Test di stabilità:

- 1 pannello è stato conservato a (4 ± 2) °C: la prova è stata eseguita dopo 7 gg;
- 1 pannello è stato conservato a (22 ± 2) °C: la prova è stata eseguita dopo 7 gg.

Gli esiti ottenuti nelle prove di omogeneità e stabilità sono stati elaborati impiegando gli stessi parametri utilizzati nelle prove preliminari.

I pannelli esaminati hanno dato esiti conformi a quelli attesi sia nelle prove di omogeneità che di stabilità.

Esecuzione delle prove ed invio dei risultati

I 5 campioni dovevano essere lavorati ed inoculati possibilmente in una stessa seduta, e dallo stesso operatore. I campioni di liquido seminale equino dovevano essere esaminati mediante inoculo su coltura cellulare RK13 (ATCC CCL-37) (preferibilmente clone Ky) secondo la procedura Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018, capitolo 2.5.10 parte B, paragrafo 1.2. (versione maggio 2013) [4], esaminandoli da una diluizione iniziale di 10^{-1} ad una finale di 10^{-3} . I reagenti ed i materiali di riferimento da impiegare nella prova dovevano essere quelli in uso presso il laboratorio partecipante.

È stato richiesto di esprimere gli esiti come risultato qualitativo (positivo, negativo), riportando per tutti i campioni l'eventuale presenza di tossicità cellulare osservata. Il modulo in formato Excel, previsto per la comunicazione dei risultati "Modulo Risultati CI AVE CC 2018", è stato inviato insieme al Protocollo CI AVE –Tecnica Colture cellulari.

Il Manuale OIE prevede l'utilizzo di un controllo positivo di lavoro (liquido seminale positivo o ceppo EAV di riferimento ad opportuna diluizione d'uso). La superficie di inoculo prevista per ogni diluizione del campione (pari a 0,04 ml/cm²), è quella di due fiaschette da 25 cm² (1 ml per fiaschetta). È stato chiesto ai laboratori di indicare quantità di inoculo e tipo di substrato cellulare utilizzati (fiaschette o piastre multiwell) nel "Modulo Risultati CI AVE CC 2018".

Valutazione statistica dei risultati

Il CeRME, acquisiti gli esiti degli esami effettuati dai singoli laboratori, ha provveduto all'elaborazione statistica delle prove valide.

Valutazione dell'accuratezza per ogni laboratorio

L'accuratezza rappresenta lo scostamento tra il risultato di una prova ed il valore di riferimento. Può essere espressa come sensibilità e specificità ed anche come concordanza per i metodi che forniscono risultati qualitativi.

In tabella 2 sono riportate le possibili combinazioni tra esito sperimentale ed esito atteso.

		ESITO ATTESO	
		POSITIVO	NEGATIVO
ESITO OTTENUTO	POSITIVO	A	B
	NEGATIVO	C	D

Tabella 2: Tabella 2x2 con le possibili combinazioni di esiti di una prova qualitativa con risultati dicotomico

La Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) analitica sono state calcolate considerando come negativi di riferimento i campioni negativi e come positivi di riferimento i campioni positivi. La Se è stata calcolata, prendendo a riferimento la tabella 2, come $A/(A+C)$, mentre la Sp come $D/(B+D)$.

La concordanza è stata valutata tramite il calcolo del Kappa di Cohen. Il K di Cohen è una misura dell'accordo tra le risposte qualitative di due osservatori (inter-observer variation) oppure del medesimo osservatore in momenti differenti (intra-observer variation), valutando gli stessi oggetti [5]. La

concordanza osservata, sempre facendo riferimento alla Tabella 2 risulterebbe $(A+D)/(A+B+C+D)$. Questa concordanza non tiene però conto dell'effetto del caso; la formula proposta da Cohen, invece, standardizza la differenza tra proporzione totale osservata e proporzione totale attesa, dividendola per la massima differenza possibile non casuale. La formula espressa matematicamente è la seguente:

$$k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

Dove p_o è la proporzione di accordo osservato, mentre p_e è la proporzione attesa per effetto del caso, per una descrizione più accurata ed esaustiva si rimanda al riferimento bibliografico.

Criteri di valutazione

Per la valutazione dei valori di Se, Sp e delle percentuali di corretta identificazione sono stati considerati soddisfacenti valori 100%.

Per la valutazione di K è stato considerato soddisfacente il valore di 1 [6].

Valutazione dell'accuratezza complessiva

L'accuratezza complessiva del sistema dei laboratori che effettuano diagnosi di AVE è stata valutata calcolando la Se, la Sp e il K multiplo (Km).

RISULTATI

Valutazione dell'esecuzione delle prove

Nella tabella 3 sono riportati i riepiloghi delle caratteristiche di esecuzione della prova in CC, per laboratorio.

Lab	Linea cellulare	N° di passaggi linea cellulare	Contenitore utilizzato (fbsk/multiwell)	Superficie pozz/fhsk (cm ²)	N° repliche per diluizione	Superficie totale (cm ²)	Volume inoculo totale	Rapporto (m l/cm ²)	Pass. a cui i camp. sono identificati come positivi	Pass. a cui i camp. sono identificati come negativi
A	RK 13 Ky	414	24 pz	1,90	2	3,80	0,40	0,11	1	2
C	RK 13 Ky	399	Flask	25,00	2	50,00	2,00	0,04	1	2
D	RK 13 ATCC	120	6 pz	9,60	3	28,80	1,20	0,04	1	2
E	RK 13 Ky	412	12 pz	3,50	4	14,00	0,40	0,03	1	3
F	RK 13 Ky	409	24 pz	1,88	3	5,64	0,24	0,04	1	3
G	RK 13 Ky	429	24 pz	1,88	2	3,76	0,10	0,03	1	1
H	RK 13 ATCC	127	Flask	25,00	2	50,00	2,00	0,04	2	2
I	RK 13 Ky	418	Flask	25,00	2	50,00	2,00	0,04	1	2
L	RK 13 ATCC	140	6 pz	9,60	4	38,40	2,00	0,05	2	3

Tabella 3: Riepilogo delle caratteristiche di esecuzione della prova in CC per laboratorio (in grassetto i valori non corretti)

In tabella 4 sono riportati i risultati attesi qualitativi (positivo o negativo) e la tossicità cellulare (presenza-assenza) per ciascun campione di liquido seminale.

Numero campione	Esito atteso	Tossicità cellulare
1	POSITIVO	Presenza
2	NEGATIVO	Presenza
3	NEGATIVO	Assenza
4	POSITIVO	Presenza
5	POSITIVO	Presenza

Tabella 4: Esito atteso e valutazione della tossicità cellulare per ciascun campione di liquido seminale.

In tabella 5 sono riportati i risultati della prova in CC per ogni laboratorio.

CAMPIONI ORIGINALI	LABORATORI								
	A	C	D	E	F	G	H	I	L
1	POSITIVO	POS TOSSICO	POS TOSSICO	POS TOSSICO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POS TOSSICO	POSITIVO
2	NEGATIVO	NEG TOSSICO	NEG TOSSICO	NEG TOSSICO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEG TOSSICO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	POSITIVO	POSITIVO	POS TOSSICO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POS TOSSICO	POSITIVO
5	POSITIVO	POS TOSSICO	POS TOSSICO	POSITIVO	POS TOSSICO	POSITIVO	POSITIVO	POS TOSSICO	POSITIVO

Tabella 5: Risultati della prova in CC per ogni laboratorio

Sensibilità, specificità e concordanza

Ai fini del calcolo della percentuale di corretta identificazione per ogni campione, è stato deciso di non considerare la citotossicità dei liquidi seminali, in quanto elemento correlabile allo stato di sensibilità della coltura cellulare alle sostanze tossiche presenti nel campione in esame.

In tabella 6 è riportato il riepilogo dei valori di sensibilità, specificità e concordanza (K di Cohen) per ciascun laboratorio.

CODICE	SENSIBILITÀ	SPECIFICITÀ	K
A	100	100	1
C	100	100	1
D	100	100	1
E	100	100	1
F	100	100	1
G	100	100	1
H	100	100	1
I	100	100	1
L	100	100	1

Tabella 6: Riepilogo dei valori di sensibilità e specificità espressi in percentuale, e valori della concordanza misurata con il K di Cohen per laboratorio.

Valutazione dell'accuratezza complessiva

In tabella 7 sono riportate le performance del sistema dei laboratori per la tecnica CC.

PERFORMANCE DEL SISTEMA (%)	
Se	100
Sp	100
K multiplo	
K1*	1,00

Soddisfacente
Non soddisfacente

Tabella 7: Performance del sistema dei laboratori che eseguono diagnosi di AVE mediante CC

La sensibilità e la specificità del sistema sono risultati soddisfacenti, pari entrambi al 100%. La concordanza tra i laboratori del sistema è risultata soddisfacente, pari a 1.

Valutazione della tossicità cellulare dei campioni

Il **Lab D** e il **Lab I** hanno valutato tutti i campioni correttamente.

Tutti i Laboratori hanno correttamente riportato la non citotossicità del campione negativo n.3.

In maniera variabile, i **Lab A, C, E, F, G, H** e **L** hanno registrato la presenza di citotossicità sia nei campioni positivi (n.1, 4 e 5), che nel campione negativo (n.2).

Come substrato cellulare, eccetto i **Lab D, H** e **L** che hanno usato la linea RK13 ATCC CCL-37 a numero di passaggi compreso tra 120 e 140, è stato utilizzato il clone KY ad un numero di passaggi variabile fra i laboratori e compreso tra 399 e 429.

I supporti utilizzati per la coltura sono stati: flask da 25 cm² (**Lab C, H** e **I**), piastre da 6 pozzetti (**Lab D** e **L**); piastre da 12 pozzetti (**Lab E**) e piastre da 24 pozzetti (**Lab A, F** e **G**). Sono risultati variabili anche il volume di inoculo totale e la superficie totale inocolata (tabella 3). Il Manuale OIE prescrive per ogni diluizione del campione di inoculare almeno due flasks da 25 cm² con un volume di 1 ml per flask, oppure piastre multiwell che rispettino tale volume e superficie. In totale quindi si dovrebbero analizzare 2 ml di ogni diluizione di campione, inoculati su 50 cm² di superficie cellulare, con rapporto volume/superficie pari a 0,04 ml/cm².

I **Lab C, H** e **I** hanno rispettato tutti i parametri (rapporto, volume e superficie

di inoculo totali). I **Lab E** e **G** hanno utilizzato un rapporto inferiore non rispettando quindi sia volume che superficie di inoculo. Il **Lab A** ha utilizzato un rapporto superiore, ma con volume e superficie di inoculo inferiori a quelli previsti; il **Lab D** e **F** pur rispettando il corretto rapporto di inoculo, hanno utilizzato volume e superficie inferiori; infine il **Lab L**, pur rispettando il volume di inoculo, ha utilizzato una superficie inferiore. I valori non corretti sono riportati in grassetto nella tabella 3.

Tutti i laboratori hanno identificato i campioni negativi a 2 o 3 passaggi in coltura come previsto dal Manuale OIE, ad eccezione del **Lab G** (1 solo passaggio).

DISCUSSIONE

Nella valutazione dell'idoneità dell'esecuzione della prova, il riferimento preso in considerazione è il Manuale OIE [4].

Tutti i laboratori partecipanti al CI AVE CC, pur utilizzando modalità difformi relative a volumi e superfici da inoculare, hanno dimostrato performance soddisfacenti dal punto di vista qualitativo in quanto sia i valori di sensibilità e specificità che quello del K di Cohen sono risultati perfetti.

Risultati discordanti si osservano relativamente alla presenza/assenza di tossicità cellulare, anche se non valutata ai fini della performance di ogni laboratorio. L'assenza di tossicità cellulare nel campione negativo n.2, può essere correlata alle caratteristiche intrinseche della linea cellulare utilizzata. L'assenza di tossicità cellulare nei tre campioni positivi invece, può essere correlata oltre alle caratteristiche intrinseche della linea cellulare utilizzata, anche alla soggettività

della lettura degli esiti da parte dell'operatore (effetto citotossico valutato come effetto citopatico).

È importante ricordare che la citotossicità alla diluizione 1:10 può mascherare un campione debolmente positivo e negativo alle diluizioni successive. Si raccomanda pertanto che, oltre ad eseguire il secondo passaggio come previsto dal Manuale OIE, deve essere esaminato in PCR il liquido seminale tal quale o il surnatante della coltura con effetto citotossico.

Il Manuale dell'OIE stabilisce che per ogni diluizione del campione, volume e superficie di inoculo siano almeno, rispettivamente, 2 ml e 50 cm² con un rapporto volume/superficie di 0,04 ml/cm², indipendentemente dal tipo di supporto utilizzato. Stabilisce inoltre, che i passaggi in coltura devono essere almeno due. Non tutti i laboratori hanno rispettato tali parametri e, pur giudicando soddisfacente la performance complessiva, se ne raccomanda la stretta osservazione in quanto una sottostima di campioni debolmente positivi, può comportare la perdita di sensibilità e di conseguenza l'autorizzazione alla monta di soggetti infetti.

Infine, Infine, come da Nota del Ministero della Salute DGSAF n.0027414 del 02/11/2018, si ribadisce che i campioni di liquido seminale positivi per virus dell'AVE devono essere inviati per la conferma al CeRME.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Guida ISO/IEC 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.
- [2] Guida ISO/IEC 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.
- [3] Linea guida ILAC-G13: 08/2007 Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes.
- [4] Equine Viral Arteritis (Infection with equine arteritis virus). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2018; Chapter 2.5.10, Part B, Section 1.2 (version adopted in May 2013). (<http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>)
- [5] Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas.*, 1960, 20:37-46.
- [6] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977, 33:159–174.