



CeRME

Centro di Referenza Nazionale
per le Malattie degli Equini

CIRCUITO INTERLABORATORIO

ARTERITE VIRALE EQUINA

Tecnica Real Time PCR

Anno 2018-2019

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 79099449 Fax: +39 06 79340724

E-mail: cerme@izslt.it

GRUPPO DI LAVORO:

Roberta Giordani, email: roberta.giordani@izslt.it

Giuseppe Manna, email: giuseppe.manna@izslt.it

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

Valentina Spallucci, email: valentina.spallucci@izslt.it

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

Massimiliano Simula, email: massimiliano.simula@izslt.it

Maria Rita Viola, email: mariarita.viola@izslt.it

Indice generale

1.SCOPO DEL CIRCUITO	4
2.DESCRIZIONE DEL CIRCUITO	4
3.Preparazione e distribuzione dei campioni.....	4
4. Controllo di qualità.....	5
4.1 Conferma dell'esito atteso.....	5
4.2 Prove di omogeneità	6
4.3 Prove di stabilità.....	6
4.4 Esecuzione delle prove ed invio dei risultati	6
4.5 Valutazione dei risultati.....	6
4.5.1 Sensibilità e specificità e concordanza.....	6
4.5.2 Valutazione quantitativa dei Ct.....	7
5. RISULTATI.....	9
5.1 Metodi utilizzati	9
5.2 Risultati qualitativi della real time PCR	9
5.3 Valutazione statistica dei risultati qualitativi.....	9
5.3.1 Valutazione dell'accuratezza.....	9
5.4 Valutazione statistica dei risultati quantitativi	12
5.4.1 Valutazione degli Z-score	12
5.4.2 Valutazione dell'attività complessiva dei laboratori (SQZ)	16
5.4.3 Valutazione della presenza di errori sistematici (SRZ)	17
6. DISCUSSIONE	19
7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	20

1. Scopo del circuito

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

Nell'adempimento dei compiti assegnati ai Centri di Riferenza, viene organizzato un circuito di prove interlaboratorio (CI) per la diagnosi di Arterite Virale Equina (AVE) mediante Real Time PCR. Lo scopo del circuito è quello di monitorare i livelli di competenza tecnica dei laboratori che effettuano diagnosi di AVE mediante Real Time PCR.

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].

2. Descrizione del circuito

L'adesione dei laboratori al Circuito è stata formalizzata tramite e-mail al CeRME. Hanno aderito 8 laboratori di altrettanti IZS, compreso quello del CeRME.

Al fine di garantire la riservatezza, ad ogni laboratorio è stato assegnato un codice univoco di identificazione, 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 risultati, trattati in forma riservata, sono stati utilizzati dal CeRME per la valutazione dei livelli di competenza tecnica dei laboratori che effettuano diagnosi di AVE mediante Real Time PCR.

I risultati sono 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.

3. Preparazione e distribuzione dei campioni

Il pannello da esaminare era composto da campioni (4 positivi e 6 negativi) di liquidi seminali equini disponibili presso il CeRME, verificati per la presenza del virus dell'AVE.

È stato successivamente attribuito un numero da 1 a 10 per allestire il pannello di partenza come riportato in Tabella 1.

Ogni campione è stato suddiviso in aliquote per i controlli di qualità (conferma del risultato atteso, prove di omogeneità e stabilità) e per l'allestimento delle aliquote da distribuire ai

laboratori partecipanti.

Ad ogni laboratorio sono stati inviati 2 pannelli ed ogni pannello era costituito da 10 campioni, ciascuno contenente 250 µl di liquido seminale equino già sonicato e centrifugato, per la prova principale e 10 di riserva per eventuali ripetizioni. Ogni campione è stato identificato progressivamente con un codice alfanumerico composto da una lettera diversa per ciascun laboratorio e un numero riferito all'aliquota (Tabella 2).

Ogni campione del secondo pannello era identificato con un codice alfanumerico composto dalla lettera R seguita dalla lettera che identificava il laboratorio, e da un numero da 11 a 20.

La temperatura di conservazione dei pannelli doveva essere di $(- 80 \pm 10) ^\circ\text{C}$.

Tabella 1: Esito atteso dei campioni del CI RT-PCR

Campione	Esito Atteso
1	POSITIVO
2	POSITIVO
3	POSITIVO
4	POSITIVO
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo

4. Controlli di qualità

4.1 Conferma dell'esito atteso

Per la conferma dei risultati attesi, sono state effettuate 4 prove per ciascuna campione, impiegando il metodo riportato da Balasuriya et al. 2002 [4], usando il kit di estrazione QIAamp cador Pathogen Mini kit (Qiagen®) ed il kit di amplificazione AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents (Thermo Fisher Scientific), i primers EAV 7.53 Fw (GGC GAC AGC CTA CAA GCT ACA) e EAV 7.256 Rv (CGG CAT CTG CAG TGA GTG A) e la probe FAM-TAMRA EAV 7.92 (TTG CGG ACC CGC ATC TGA CCA A). Le varianze dei Ct dei campioni positivi sono state confrontate con il test di omogeneità delle varianze (o Test di Levene); il test è risultato non significativo. Si è proceduto quindi con il calcolo della deviazione standard complessiva e degli intervalli di confidenza (Media \pm 2 dev.

standard) dei Ct di ciascun campione, in modo da creare un intervallo di riferimento [7].

4.2 Prove di omogeneità

Per le prove di omogeneità sono state analizzate 4 aliquote di ciascun campione, in un'unica seduta. Il risultato si è dimostrato omogeneo.

4.3 Prove di stabilità

Per le prove di stabilità sono stati analizzati due pannelli di campioni: uno conservato a +4°C per 7 gg e l'altro conservato a +37°C per 7 gg. Queste due condizioni di conservazione non hanno modificato il risultato qualitativo della prova.

4.4 Esecuzione delle prove ed invio dei risultati

I campioni dovevano essere estratti e analizzati possibilmente dallo stesso operatore in un'unica seduta. Il metodo per la ricerca dell'RNA virale è quello indicato nella nota del Ministero della Salute [5]. La nota fa riferimento all'ultimo aggiornamento del Manuale OIE [6] che indica il metodo descritto da Balasuriya et al. (2002) [4]. I reagenti ed i materiali di riferimento da impiegare nella prova devono essere quelli in uso presso il laboratorio partecipante.

Gli esiti devono essere espressi come risultato categorico (positivo, negativo), riportando per tutti i campioni il valore di Ct. Per l'inserimento e l'invio dei risultati delle prove sono stati allestiti dei fogli Excel in cui si annotava la metodica, il kit di estrazione, la mix di amplificazione, l'esito e il Ct di ogni campione.

4.5 Valutazione dei risultati

4.5.1 Sensibilità, specificità e concordanza

Per l'analisi dei risultati è stata valutata la sensibilità, la specificità e la concordanza. La sensibilità e la specificità sono state calcolate rispettivamente come la proporzione tra numero di positivi e di negativi rilevati dal laboratorio rispetto al numero atteso di positivi e negativi. Il limite di accettabilità della concordanza è il seguente:

$K < 0.99$ Insoddisfacente;

$K \geq 1$ Soddisfacente.

4.5.2 Valutazione quantitativa dei Ct

Valutazione quantitativa del titolo La valutazione dei risultati di ciascun campione è stata condotta attraverso il calcolo del valore di z-score:

$$z - score = \frac{X_i - X_a}{NIQ}$$

dove:

X_i = risultato fornito dal laboratorio i-esimo

X_a = valore assegnato

NIQ = intervallo interquartile normalizzato = $(Q3-Q1)*0,7413$

Il valore assegnato, considerato come stima attendibile del valore vero, è stato stabilito attraverso il calcolo della media geometrica dei risultati ottenuti nelle prove preliminari per ciascun liquido seminale equino. L'intervallo interquartile è stato calcolato mediante differenza tra il 3° ed il 1° quartile della distribuzione dei risultati ottenuti nelle prove preliminari per ciascun campione. I laboratori potranno valutare la propria attività secondo i seguenti criteri:

$|z| < 2$ soddisfacente

$2 < |z| < 3$ discutibile

$|z| > 3$ insoddisfacente

Al campione negativo, correttamente individuato, è stato assegnato uno z-score di zero.

Per valutare la prestazione complessiva del laboratorio, è stato calcolato un indice definito dalla somma dei quadrati dei valori di z- score del singolo laboratorio (SQZ lab):

$$SQZ_{Lab} = \sum_{i=1}^n Z_i$$

Dove:

n = numero di campioni analizzati per ciascun laboratorio

Z_i = valore di z-score relativo al campione i-esimo

Con lo stesso criterio è stato valutato il sistema diagnostico nel suo complesso, prendendo in considerazione tutti i valori di z-score calcolati per i singoli laboratori partecipanti.

I limiti di accettabilità della prestazione individuale e complessiva dei laboratori sono stati definiti

mediante confronto con i valori critici di una distribuzione χ^2 con n gradi di libertà e α pari a 0,0455 e 0,0027 (valori corrispondenti ad uno z-score di 2 e 3).

In Tabella 3 sono riportati i valori limite del SQZ con n° 10 valori di z-score in funzione del numero dei campioni distribuiti ed esaminati per laboratorio, impiegati per valutare l'attività globale del laboratorio; si riportano inoltre i valori limite con n° 80 valori di z-score, impiegati per valutare il sistema diagnostico nel suo complesso.

Tabella 2: valori limite per l'interpretazione del valore di SQZ

N. valori z-score	SQZ ($\alpha=0,0455$)	SQZ ($\alpha=0,0027$)
10	18,61	26,90
80	101,42	118,47

I criteri di valutazione sono i seguenti:

SQZ lab \leq SQZ ($\alpha = 0,0455$; n) soddisfacente

SQZ ($\alpha = 0,0455$; n) < SQZ lab < SQZ ($\alpha = 0,0027$; n) discutibile

SQZ lab \geq SQZ ($\alpha = 0,0027$; n) insoddisfacente

Inoltre, per verificare la presenza di errori sistematici nei risultati forniti dai laboratori, è stato calcolato l'indice SRZ basato sulla somma degli z-score.

$$SRZ_{Lab} = \frac{\sum_{i=1}^n z_i}{\sqrt{n}}$$

dove:

n = numero di campioni analizzati per ciascun laboratorio

Zi = valore di z-score relativo al campione i-esimo

I criteri di valutazione sono i seguenti:

$|SRZ| \leq 2$ soddisfacente

$2 < |SRZ| < 3$ discutibile

$|SRZ| \geq 3$ insoddisfacente

5. Risultati

5.1 Metodi utilizzati

Sette laboratori hanno utilizzato il metodo Balasuriya et al., (2002), mentre uno ha utilizzato il kit commerciale: TaqVet Equine Arteritis Virus (Applied Biosystems).

5.2 Risultati qualitativi della real time PCR

I risultati qualitativi relativi alla prova per ogni laboratorio sono riportati in dettaglio nella Tabella 2.

Tabella 3: Codifica alfanumerica dei pannelli distribuiti a ciascun laboratorio con relativo esito ottenuto.

N° CAMPIONE ed esito atteso	Lab A		Lab C		Lab D		Lab F		Lab G		Lab H		Lab I		Lab L	
	camp	ESITO														
1- POSITIVO	A6 RA14	POS	C7 RC16	POS	D3 RD16	POS	F1 RF18	POS	G1 RG15	POS	H9 RH12	POS	I10 RI19	POS	L4 RL20	POS
2- POSITIVO	A2 RA19	POS	C6 RC14	POS	D10 RD20	POS	F5 RF11	POS	G10 RG11	POS	H1 RH19	POS	I5 RI15	POS	L7 RL11	POS
3- POSITIVO	A9 RA11	POS	C9 RC15	POS	D6 RD19	POS	F3 RF13	POS	G5 RG14	POS	H5 RH15	POS	I9 RI11	POS	L9 RL18	POS
4- POSITIVO	A8 RA13	POS	C10 RC18	POS	D8 RD17	POS	F10 RF16	POS	G6 RG18	POS	H7 RH17	POS	I2 RI13	POS	L5 RL16	POS
5- NEGATIVO	A1 RA15	neg	C2 RC20	neg	D2 RD15	neg	F7 RF17	neg	G2 RG16	neg	H10 RH18	neg	I1 RI17	neg	L1 RL13	neg
6- NEGATIVO	A7 RA20	neg	C4 RC11	neg	D9 RD11	neg	F8 RF12	neg	G8 RG13	neg	H3 RH11	neg	I3 RI16	neg	L6 RL15	neg
7- NEGATIVO	A5 RA17	neg	C8 RC13	neg	D4 RD12	neg	F9 RF20	neg	G7 RG12	neg	H6 RH16	neg	I8 RI14	neg	L2 RL14	neg
8- NEGATIVO	A3 RA12	neg	C3 RC19	neg	D7 RD18	neg	F6 RF15	neg	G9 RG17	neg	H8 RH20	neg	I6 RI12	neg	L3 RL12	neg
9- NEGATIVO	A4 RA16	neg	C5 RC17	neg	D1 RD13	neg	F2 RF19	neg	G4 RG19	neg	H2 RH14	neg	I4 RI20	neg	L10 RL19	neg
10- NEGATIVO	A10 RA18	neg	C1 RC12	neg	D5 RD14	neg	F4 RF14	neg	G3 RG20	neg	H4 RH13	neg	I7 RI18	neg	L8 RL17	neg

5.3 Valutazione statistica dei risultati qualitativi

5.3.1 Valutazione dell'accuratezza.

L'accuratezza rappresenta lo scostamento tra il risultato di una prova ed il valore di riferimento. Può essere espressa come sensibilità e specificità e concordanza, per i metodi che forniscono risultati qualitativi. In Tabella 3 sono riportate le possibili combinazioni tra esito sperimentale ed esito atteso.

Tabella 4: Tabella 2X2 con le possibili combinazioni di esiti di una prova qualitativa con esiti dicotomici

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

La Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) relativa 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 3, come $A/(A+B)$, mentre la Sp come $D/(C+D)$.

La concordanza è stata valutata tramite il calcolo del K di Cohen. Il Kappa di Cohen è una misura dell'accordo tra le risposte qualitative di due osservatori (interobserver variation) oppure del medesimo osservatore in momenti differenti (intraobserver variation), valutando gli stessi oggetti [1].

La concordanza osservata, sempre facendo riferimento alla Tabella 3 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.

In tabella 5 sono riportati i valori di Se e Sp di ciascun laboratorio.

Tabella 5: Valori di Sensibilità e Specificità relativa di ciascun laboratorio

	Laboratorio	Se (%)	Sp (%)
	A	100	100
	C	100	100
Soddisfacente	D	100	100
Abbastanza soddisfacente	F	100	100
Insoddisfacente	G	100	100
	H	100	100
	I	100	100
	L	100	100

In tabella 6 sono riportati i valori di K di Cohen

Tabella 6: Valori di K di Cohen di ciascun laboratorio

	Laboratorio	K (%)
	A	100
	C	100
Soddisfacente	D	100
Insoddisfacente	F	100
	G	100
	H	100
	I	100
	L	100

Tutti i laboratori hanno ottenuto un valore del 100%.

In tabella 7 sono riportati i valori di Se e Sp calcolati complessivamente e il K multiplo del sistema nazionale di diagnosi AVE con il relativo valore di Z e la significatività statistica [7] [8].

Tabella 7: Valori di Se e Sp calcolati complessivamente e il K multiplo

Soddisfacente	K MULTIPLO	1
Abbastanza soddisfacente	Z score	1
Insoddisfacente	Significatività	p<0,005
	Se	100
	Sp	100

5.4 Valutazione statistica dei risultati quantitativi

5.4.1. Valutazione degli z-score

Tabella 8: Ct ottenuti dai laboratori

Lab A		Lab C		Lab D		Lab F		Lab G		Lab H		Lab I		Lab L	
camp	Ct	camp	Ct	camp	Ct	camp	Ct	camp	Ct	camp	Ct	camp	Ct	camp	Ct
A6	20,25	C7	19,7	D3	18,37	F1	20,36	G1	18,42	H9	22,10	I10	17,90	L4	19,47
A2	21,36	C6	24	D10	19,74	F5	23,16	G10	20,21	H1	23,60	I5	23,30	L7	22,08
A9	23,2	C9	24,5	D6	20,88	F3	24,94	G5	20,55	H5	25,70	I9	24,94	L9	23,12
A8	32,23	C10	27,5	D8	25,79	F10	29,72	G6	28	H7	31,00	I2	27,48	L5	27,71

La tabella 8 contiene i valori medi dei Ct dei campioni positivi ottenuti da ciascun laboratorio e che sono stati utilizzati per il calcolo dello z-score.

Nelle tabelle 9, 10, 11 e 12 vi sono i grafici relativi rispettivamente ai campioni 1, 2, 3 e 4. In azzurro le barre dei valori dello Z-score ottenuto da ogni laboratorio, con il relativo valore numerico. La linea tratteggiata verde indica il limite discutibile, entro il quale i valori di z-score sono considerati soddisfacenti, mentre la linea tratteggiata rossa indica il limite insoddisfacente, entro il quale i valori di z-score sono considerati discutibili, mentre oltre la linea tratteggiata rossa i valori di z-score sono insoddisfacenti.

Tabella 9: Andamento dei valori dello Z-score del campione 1

Campione 1 - Andamento dei valori dello Z-score

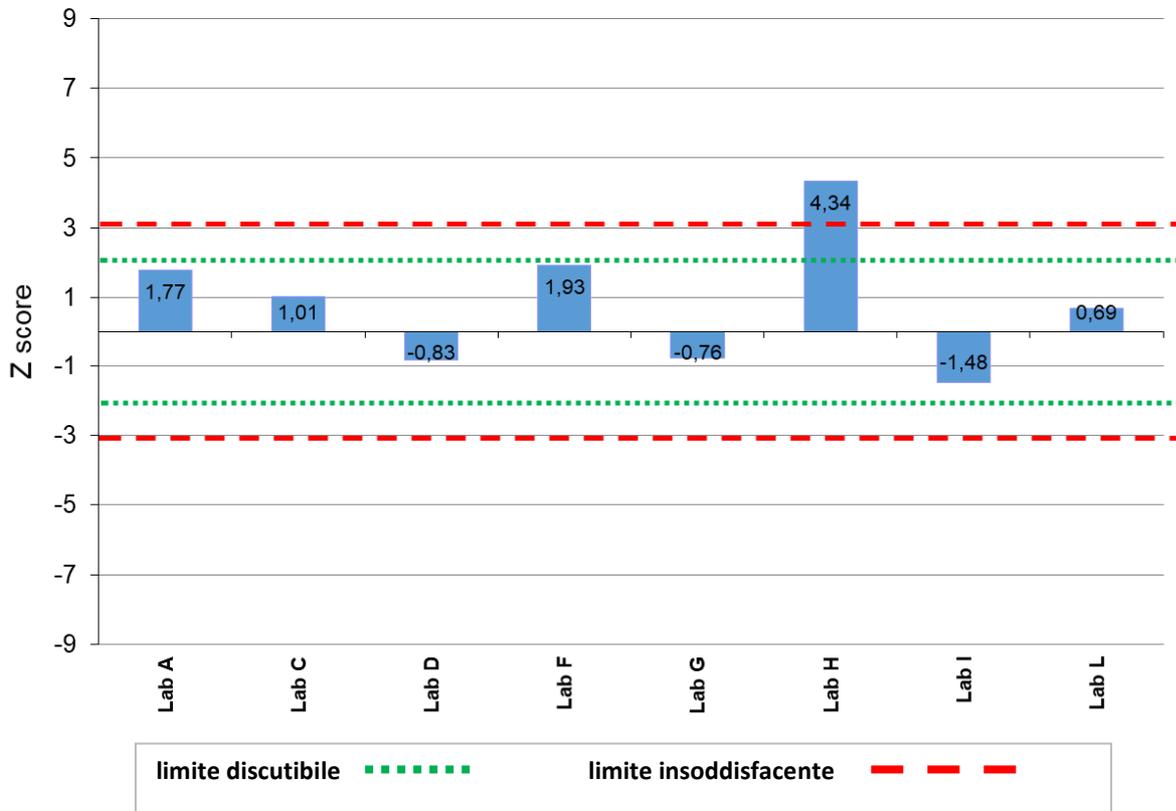


Tabella 10: Andamento dei valori dello Z-score del campione 2

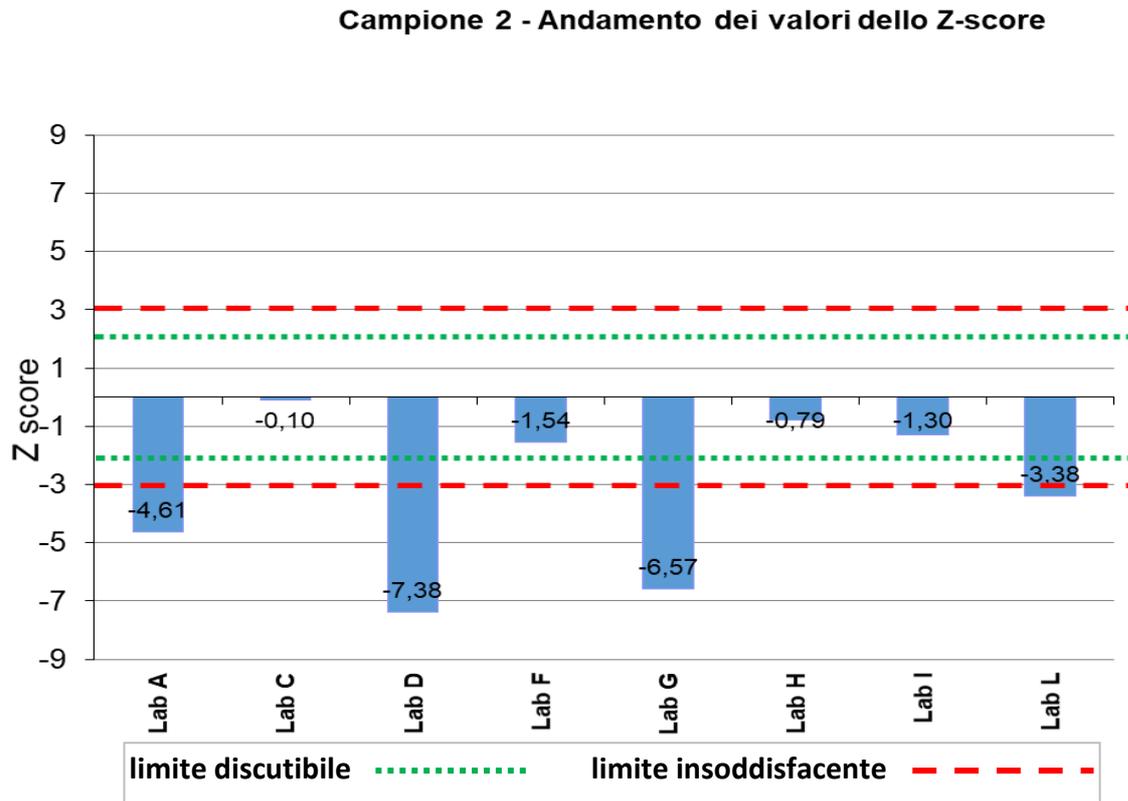


Tabella 11: Andamento dei valori dello Z-score del campione 3

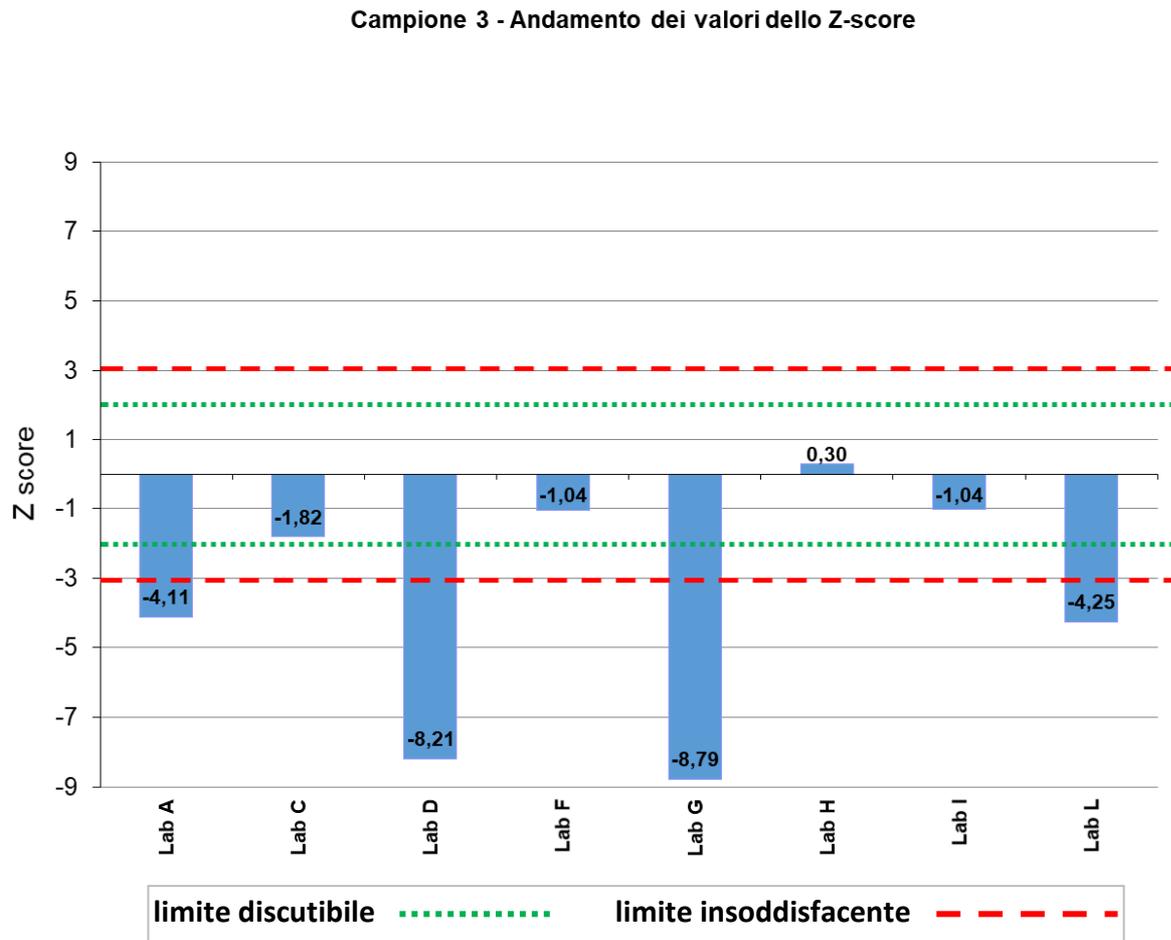
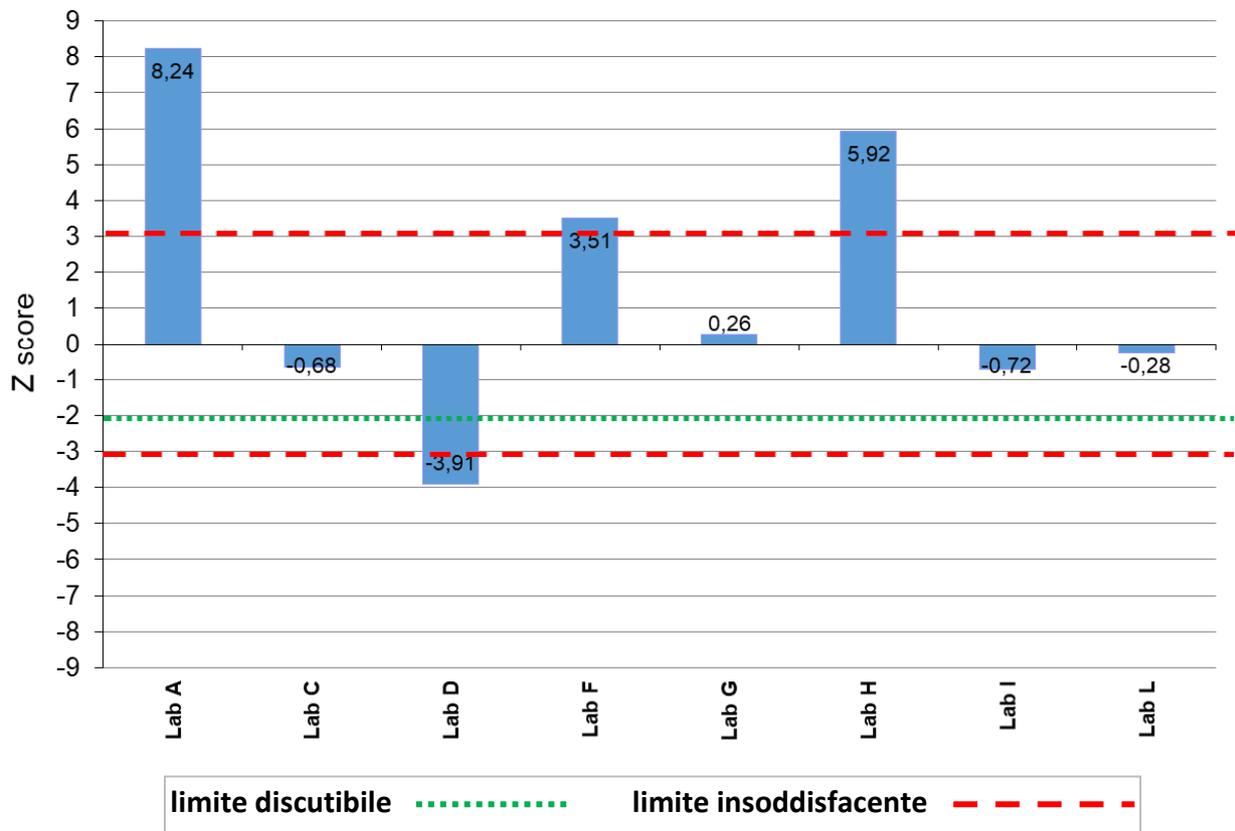


Tabella 12: Andamento dei valori dello Z-score. Campione 4

Campione 4 - Andamento dei valori dello Z-score



Analizzando il campione positivo n. 1, i laboratori A, C, D, F, G, I, L, hanno ottenuto uno z-score soddisfacente, mentre il laboratorio H ha ottenuto un valore insoddisfacente.

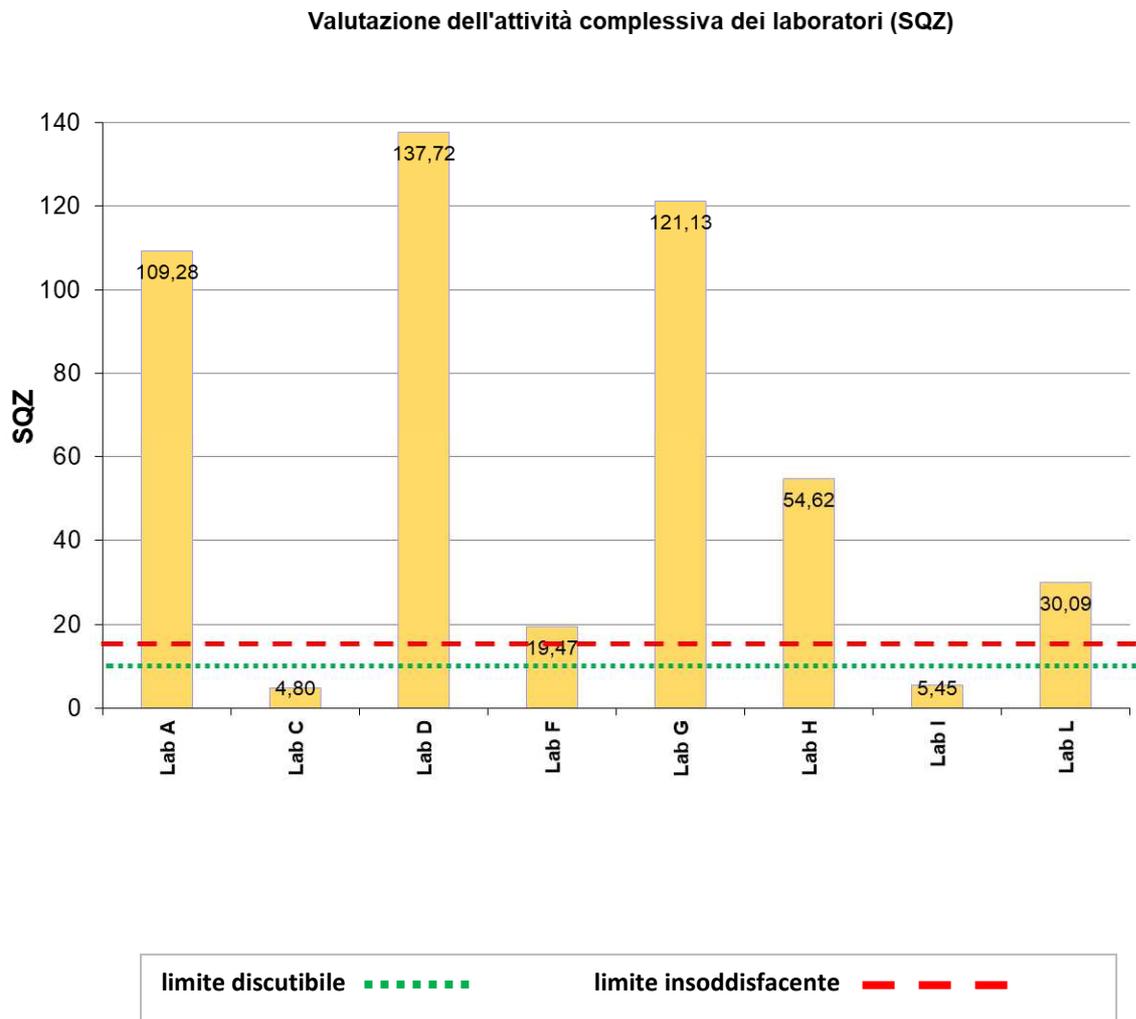
Per il campione positivo n. 2, i laboratori C, F, H, I, hanno ottenuto uno z-score soddisfacente, i laboratori A, D, G e L hanno ottenuto un valore insoddisfacente.

Per il campione positivo n. 3, i laboratori C, F, H, I, hanno ottenuto uno Z-score soddisfacente, i laboratori A, D, G e L hanno ottenuto un valore insoddisfacente.

Per il campione positivo n. 4 i laboratori C, G, I, L, laboratori hanno ottenuto uno Z-score soddisfacente, i laboratori A, D, F, e H hanno ottenuto un valore insoddisfacente.

5.4.2. Valutazione dell'attività complessiva dei laboratori (SQZ)

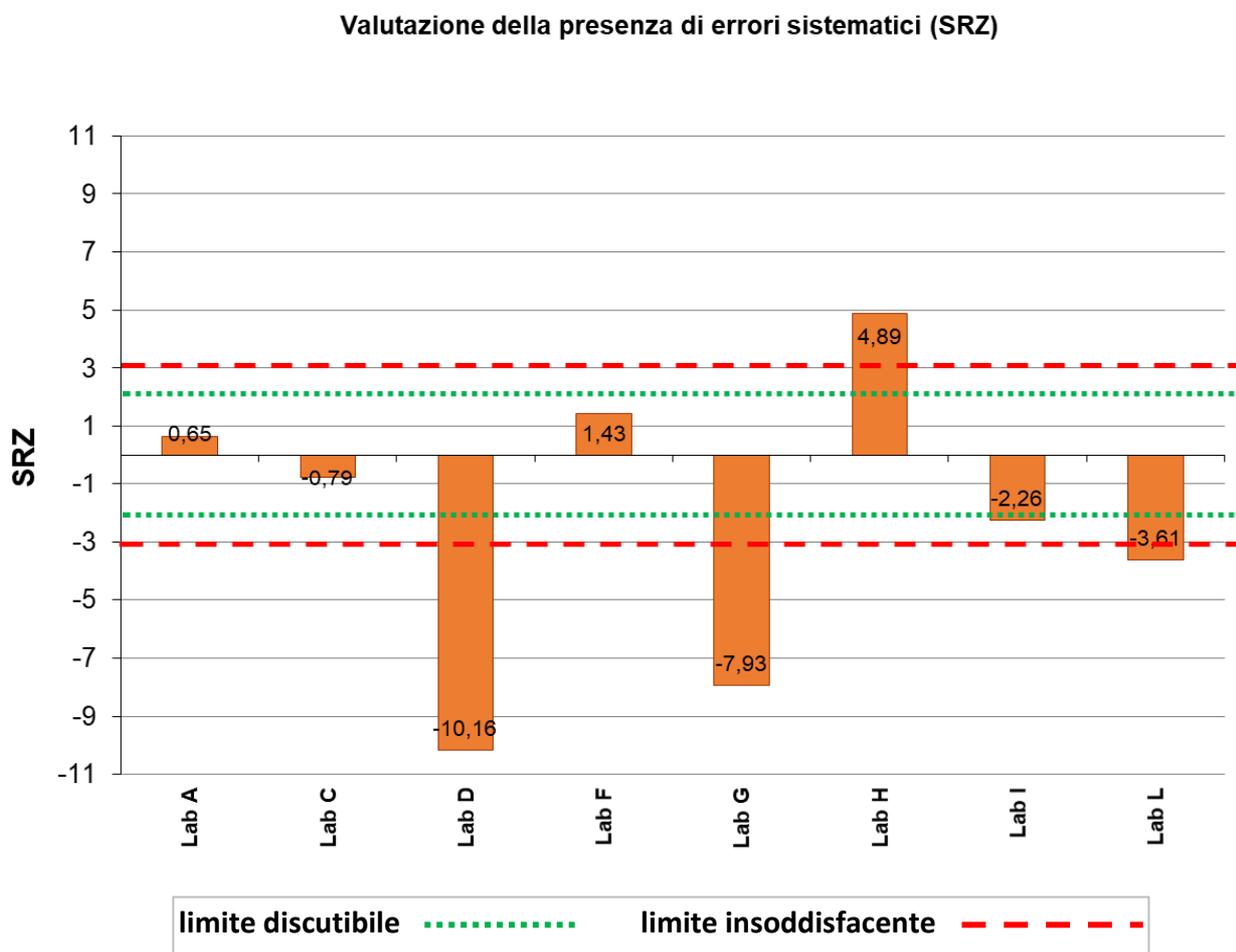
Tabella 13: Valutazione della somma dei quadrati dello z-score (SQZ)



Il calcolo del SQZ per valutare l'attività complessiva dei laboratori ha mostrato che i laboratori C e I sono risultati soddisfacenti mentre i laboratori A, D, F, G, H, L hanno ottenuto valori insoddisfacenti.

5.4.3. Valutazione della presenza di errori sistematici (SRZ)

Tabella 14: Valutazione di errori sistematici (SRZ)



La valutazione della presenza di errori sistematici (SRZ) per ciascun laboratorio ha evidenziato che i laboratori A, C, F, hanno ottenuto valori soddisfacenti, il laboratorio I ha ottenuto un valore discutibile, mentre i laboratori D, G, H, hanno ottenuto valori insoddisfacenti.

Tabella 15: valori di SQZLab e SRZLab utilizzati per valutare la performance di ciascun laboratorio e totale, e per evidenziare la presenza di errori sistematici

Codice	SQZ _{Lab}	SRZ _{Lab}	SQZ _{Lab} totale
Lab A	109,28	0,65	482,55
Lab C	4,80	-0,79	
Lab D	137,72	-10,16	
Lab F	19,47	1,43	
Lab G	121,13	-7,93	
Lab H	54,62	4,89	
Lab I	5,45	-2,26	
Lab L	30,09	-3,61	

Tabella 16: Giudizio sugli indicatori di performance ottenuti dai vari laboratori e giudizio complessivo del laboratorio.

S=soddisfacente, D= discutibile, I= insoddisfacente

Laboratorio	Sensibilità	Specificità	K Cohen	SQZ _{Lab}	SRZ _{Lab}	Giudizio Complessivo
A	S	S	S	I	S	S
C	S	S	S	S	S	S
D	S	S	S	I	I	S
F	S	S	S	I	S	S
G	S	S	S	I	I	S
H	S	S	S	I	I	S
I	S	S	S	S	D	S
L	S	S	S	I	I	S
SQZ _{Lab} totale	I					

6. Discussione

Lo scopo di questo circuito era valutare le capacità dei laboratori nel classificare correttamente campioni positivi e campioni negativi.

Tutti i laboratori hanno dimostrato di possedere performance soddisfacenti dal punto di vista qualitativo in quanto sia i valori di sensibilità e specificità che la K di Cohen sono risultati perfetti.

La valutazione quantitativa dei Ct ha invece rilevato delle criticità rispetto agli z-score ottenuti e conseguentemente per i valori di SQZlab. Diversi laboratori hanno avuto bassa accuratezza sottostime o sovrastima dei Ct di riferimento. Anche la valutazione degli errori sistematici SRZ vede alcuni laboratori collocarsi al di fuori dei limiti e questo dovrebbe indurre a riesaminare le procedure utilizzate per eliminare eventuali criticità.

Va posta attenzione alla valutazione dei dati perché l'indice SQZ è influenzato anche dagli z-score negativi (teoricamente indice di maggiore sensibilità analitica). Quindi un laboratorio che effettivamente disponga di una metodica più sensibile otterrebbe un SQZ alto. Inoltre, va tenuto in considerazione che la valutazione dei Ct ottenuti non ha un significato assoluto perché i valori soglia dei cicli termici, che sono stati ottenuti dai vari laboratori per ogni singolo campione positivo, potrebbero essere stati influenzati da settaggi diversi dei parametri di lettura impostati in ogni laboratorio.

Il Responsabile del Centro di Referenza
per le Malattie degli Equini
Maria Teresa Scicluna

7. 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] Balasuriya et al., (2002) Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods*, 101, 21–28.
- [5] Nota del Ministero della Salute “Arterite virale equina - Decisione di esecuzione (UE) 2018/1143 della Commissione Europea del 10 agosto 2018 (0027414-02/11/2018-DGSAF-MDS-P)”.
- [6] Equine Viral Arteritis (Infection with equine arteritis virus). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2018; Part 2, Section 2.2, Chapter 2.5.10. (<http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>).
- [7] Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas.*, 1960, 20:37-46.
- [8] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977, 33:159–174.