

CONSIDERAZIONI SUL TREND DEI RISULTATI DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO PER LA DIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI CONDOTTI NEL CORSO DEGLI ULTIMI 9 ANNI

Ricci L.¹, Gasperetti L.¹, D'Alonzo A.¹, Nardini R.¹, Giusti C.¹, Forletta R.¹

¹Centro Referenza per l'Anemia infettiva degli equini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Sezione di Pisa

Keywords: Interlaboratory comparison, equine infectious anemia, agar gel immunodiffusion

ABSTRACT

An inter-laboratory proficiency test for Agar Gel Immunodiffusion (AGID) used for the detection of Equine Infectious Anemia (EIA) antibodies in equids has been coordinated by the National Reference Centre (NRC) since 2002 to the present, with a growing number of participating labs. Over the period 2006-2010, 65 laboratories participated performing one or both methods prescribed for AGID, Coggins test and technique recommended by the OIE Manual. Data analysis shows a progressive improvement of the individual technical capacity of the lab, demonstrated by an increase of accordance to expected results; the interlaboratory comparison also highlights an achievement of a very good repeatability and reproducibility for AGID. Interlaboratory comparison is an important instrument used to verify technical capacity of labs and allows to identify and resolve problems in the method execution, essential in maintaining high quality standards for laboratory accreditation.

INTRODUZIONE

In base a quanto previsto dal D.M. 4/10/1999, il Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) organizza annualmente dal 2002 un Circuito Interlaboratorio (CI) per valutare la competenza tecnica dei singoli laboratori nell'AGID impiegata per la diagnosi di Anemia Infettiva Equina (AIE), soprattutto in riferimento alla possibile presenza di sieri debolmente positivi di difficile interpretazione. Parallelamente al CI organizzato, il CRAIE ha partecipato con continuità dal 2002 con esito sempre favorevole a prove di confronto interlaboratorio organizzate a livello europeo.

Il CI prevede l'esecuzione di prove o misurazioni specifiche in condizioni operative simili per tutti i laboratori partecipanti, che vengono verificati al fine di valutare la performance diagnostica individuale (3; 6; 7). Soltanto la soddisfacente partecipazione al CI, con l'adozione delle eventuali azioni correttive previste qualora emergano delle criticità, consente di mantenere gli standard qualitativi richiesti per le prove accreditate (1; 3; 6).

Il CI organizzato dal CRAIE ha raccolto un'adesione crescente da parte dei laboratori autorizzati, passando da 18 del 2002 a 72 nel 2004, valore che si è mantenuto più o meno costante negli anni successivi. Fino al 2005, il CI ha previsto soltanto l'esecuzione del test di Coggins, che dal 2006 fino al 2010 è stato sempre associato alla tecnica AGID descritta nel Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE (Manuale OIE) (5). L'AGID eseguita con metodo OIE impiega un unico strato di agar invece del doppio strato previsto dal test di Coggins, che facilita la preparazione del terreno, e anticipa la lettura da 48 a 24 ore, riducendo i tempi della prova; questo metodo ha affiancato e sostituito nel tempo, il test di Coggins in molti laboratori.

Dei laboratori partecipanti, 65 hanno sempre aderito al CI eseguendo una o entrambe le tecniche.

Il presente contributo vuole illustrare i risultati ottenuti negli anni 2006-2010, più facilmente comparabili, anche in rapporto alla situazione precedente.

MATERIALI E METODI

Dal 2006 al 2010 hanno partecipato al CI 65 laboratori distribuiti tra Sedi e Sezioni degli I.I.ZZ.SS., oltre al Laboratorio di Igiene Ambientale di San Marino ed il Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria di Roma. Il pannello distribuito ai singoli laboratori comprendeva ogni anno n°10 sieri di cui 7 positivi a diverso grado di positività, e 3 negativi; soltanto nel 2008 i sieri positivi erano 8 ed i negativi 2.

I sieri selezionati per il circuito sono allestiti a partire da sieri equini di collezione positivi e negativi all'AGID, nonché sieri di riferimento, disponibili presso il CRAIE; quelli positivi possono essere diluiti in siero negativo per ottenere sieri a diverso grado di positività. I sieri da distribuire sono sottoposti preventivamente a prove di omogeneità e stabilità (2) al fine di garantire l'uniformità dei misurandi per l'esecuzione delle verifiche di ripetibilità e riproducibilità delle prove effettuate. Il kit diagnostico impiegato è validato dal CRAIE come previsto dal D.M. 4/10/1999.

La valutazione statistica dei risultati è effettuata utilizzando il kappa (K) singolo per stimare il grado di accordo tra i risultati ottenuti dal singolo laboratorio e quelli attesi; per valutare invece il grado di accordo complessivo dei laboratori partecipanti, in riferimento alle metodiche eseguite è impiegato il K multiplo (4). Il K permette di valutare la concordanza degli esiti eliminando la componente attribuibile semplicemente all'effetto del caso. Il massimo grado di accordo possibile si ha quando K assume il valore di 1.

Per l'interpretazione del valore di K, viene utilizzata la tabella di valutazione di Altman di seguito riportata (Tabella 1):

Tabella 1: tabella di valutazione di Altman

VALORE DI K	Grado di accordo
<0,20	scarso
0,21- 0,40	mediocre
0,42 - 0,60	medio
0,61- 0,80	buono
0,81- 1	Molto buono

RISULTATI

Dei 65 laboratori, che hanno sempre partecipato al CI tra il 2006 ed il 2010, 27 hanno sempre ottenuto un K singolo pari ad 1. In tabella 2, è riportata la distribuzione dei laboratori negli anni in funzione della classificazione di Altman.

Tabella 2: valori di K singolo ottenuti

		ANNO				
		2006	2007	2008	2009	2010
VALORE DI K	0,21- 0,40	8	1	2	1	0
	0,42 - 0,60	5	0	0	0	1
	0,61- 0,80	7	2	0	2	1
	0,81- 1	45	62	63	62	63

I campioni non correttamente identificati da laboratori con $K < 1$, sono quasi esclusivamente attribuibili a sieri debolmente positivi, di difficile lettura: il 76% (64/84) con il test di Coggins e l'82% (47/57) con l'AGID metodo OIE in tutto il periodo considerato. Considerando il totale dei campioni positivi esaminati, non sono stati correttamente individuati il 7,6 % dei sieri debolmente positivi ed il 1,4 % dei sieri chiaramente positivi; in tabella 3 vengono riportate in dettaglio le percentuali di errore in riferimento alle due metodiche impiegate. Il riscontro occasionale di campioni negativi non identificati correttamente è da collegare a probabili errori di trascrizione degli esiti.

Tabella 3: percentuali di errore per i campioni positivi

	COGGINS	OIE
% PD errati/P totali	4,3	3,3
% P errati/P totali	0,9	0,5
TOTALE	5,2	3,8

L'elaborazione del K multiplo per valutare il grado di accordo ottenuto complessivamente dai laboratori partecipanti nei singoli anni è riportata di seguito in tabella 4.

Per i laboratori che hanno eseguito entrambe le metodiche, i risultati ottenuti con le due tecniche sono sempre sovrapponibili.

Tabella 4: valori di K multiplo ottenuti anni 2006-2010

ANNO	2006	2007	2008	2009	2010
AGID Coggins	0,78	0,94	1	0,94	0,95
AGID OIE	0,77	0,98	1	0,97	0,98

DISCUSSIONE

Il numero costantemente elevato di laboratori che ha aderito al CI negli anni ne dimostra l'utilità e l'importanza per il mantenimento degli standard qualitativi richiesti dall'accreditamento. Inoltre, elemento di maggior rilievo, la verifica delle performances diagnostiche individuali e complessive, è indispensabile ai fini della valutazione dell'efficienza del sistema diagnostico nazionale anche in relazione al Piano di Controllo dell'AIE.

Il mantenimento di adeguati livelli tecnici di esecuzione, monitorati su base continua attraverso il CI, fornisce garanzia di diagnosi.

L'introduzione dell'AGID con la metodica OIE nel CI ha permesso una verifica costante nei laboratori di prova, che in numero sempre maggiore l'hanno adottata, affiancandola e in molti casi sostituendola al test di Coggins, con una conseguente riduzione dei tempi di esecuzione e risparmio in termini di reagenti.

Il numero crescente dei laboratori con K singolo $\geq 0,8$ e grado di accordo "molto buono" evidenzia il complessivo miglioramento delle performances diagnostiche individuali.

Di conseguenza, anche l'elaborazione del K multiplo dimostra il raggiungimento complessivo di elevati standard qualitativi. Il mantenimento di valori molto prossimi all'1, ovvero del massimo grado di accordo possibile, testimoniano la stabilità dei due metodi di prova con ottimi livelli di ripetibilità e riproducibilità per il test di Coggins ma ancora di più per la tecnica OIE.

Il miglioramento globale ottenuto si evince anche comparando i risultati del periodo 2006-2010 a quello degli anni precedenti riportato in tabella 5, che accentuano l'incremento totale del

valore di K. Il minor grado di accordo raggiunto nel 2006 è verosimilmente associabile all'introduzione nel pannello di sieri positivi di più difficile interpretazione al limite della rilevabilità. Questo alla luce dei focolai riscontrati nello stesso anno nel territorio nazionale, che hanno reso necessaria una maggiore attenzione nei confronti di tali campioni, anche in funzione dell'imminenza dell'attuazione del Piano Nazionale di Controllo.

Tabella 5: valori di K multiplo ottenuti anni 2002-2005

ANNO	2002	2003	2004	2005
AGID Coggins	0,74	0,87	0,96	0,92

Nell'AIE, a differenza di altre patologie come la Leucosi Bovina, è frequente il riscontro di reattività al limite, come ampiamente descritto in bibliografia. Si sottolinea che nel corso della diagnostica corrente, la percentuale di errore sui sieri debolmente positivi potrebbe essere superiore rispetto a quella osservata nel corso del CI, in quanto l'attenzione posta in corso di lettura dei risultati rispetto ad una prova valutativa interlaboratorio è certamente superiore.

La mancata identificazione di una discreta percentuale di sieri debolmente positivi rende pertanto necessaria l'introduzione di tecniche di screening più sensibili e di oggettiva lettura al fine di reclutare il maggior numero di soggetti positivi ed aumentare l'efficacia delle azioni di sorveglianza. L'introduzione dell'ELISA, impiegato in misura sempre maggiore come test di screening, grazie alle caratteristiche di elevata sensibilità, rapidità di esecuzione ed oggettività del test, potrebbe costituire uno strumento di verifica utile per i laboratori che eseguono la prova. Un altro importante elemento che emerge dai dati raccolti, è che i minori gradi di concordanza sono stati osservati in laboratori che esaminano un modesto numero di campioni, rimarcando il ruolo fondamentale dell'esperienza nell'esecuzione di queste prove. Pertanto, è auspicabile che gli Istituti effettuino delle scelte organizzative, concentrando la diagnostica specifica presso strutture che effettuano livelli di attività più consistenti. L'importanza dell'esperienza nella corretta esecuzione e lettura del test è dimostrata anche dai risultati ottenuti a livello europeo, con prestazioni nazionali migliori degli altri Paesi, probabilmente proprio per l'attività svolta negli ultimi anni, che ha migliorato in termini generali le capacità tecniche individuali e complessive relativamente ai metodi impiegati per la diagnosi di AIE.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ACCREDIA, 2010. PROVE VALUTATIVE in REGOLAMENTI TECNICI RT-24 rev. 01
- 2) Guidelines OIE 1998. Guidelines of the Office International des Epizooties for laboratory quality evaluation, for international reference standards for antibody assays and for laboratory proficiency testing. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 17 (2), 600-609
- 3) <http://www.oie.int/our-scientific-expertise/reference-laboratories/proficiency-testing/>
- 4) Langton S.D., Chevennement R., Nagelkerke N., Lombard B., 2002. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: concordance and concordance. International Journal of Food Microbiology 79: pp. 175-181
- 5) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Part 2 Section 2.5 Chapter 2.5.6 pagg. 866-870
- 6) UNI CEI EN ISO/IEC 17025 par. 5.9
- 7) UNI CEI EN ISO/IEC 17043 par. 3.4