

VALUTAZIONE DI ALCUNE PERFORMANCE DIAGNOSTICHE DI KIT ELISA PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI ANEMIA INFETTIVA EQUINA (AIE)

Nardini R.*^[1], Scicluna M.T.^[1], Terregino C.^[2], Mandola M.L.^[4], Cavaliere N.^[6], Cordioli P.^[7], Fusco G.^[8], Purpari G.^[9], Angioni A.^[3], Panzieri C.^[5], Manca M.^[10], Autorino G.^[1]

Keywords: Equine Infectious Anemia, ELISA, Comparative Evaluation

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

^[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Padova,

^[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise ~ Teramo,

^[4]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte Liguria e Valle d'Aosta ~ Torino,

^[5]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche ~ Perugia,

^[6]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata ~ Foggia,

^[7]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna ~ Brescia,

^[8]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno ~ Napoli,

^[9]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia ~ Palermo,

^[10]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna ~ Sassari

SUMMARY: Data on evaluation of some diagnostic parameters of all ELISA kits available in Italy for the serodiagnosis of AIE are presented and discussed. Ten laboratories were involved using a panel of 30 sera ran with 4 commercial kits and 2 in-house kits. Kits were also evaluated using a panel of sera from vaccinated animals at different days post vaccination (p.v.). All sera were also tested in agar gel immunodiffusion (AGID). The parameters evaluated were: diagnostic sensitivity (DSe) and specificity (DSp), Cohen K, weighted Cohen K, coefficient of variation (CV), accordance, concordance. Analysis of these parameters indicates that all kits have a higher sensitivity than AGID, even if a complete evaluation, as indicated by OIE (1) should be carried out.

INTRODUZIONE: I test sierologici sono ancora oggi impiegati nei piani di sorveglianza ed ai fini della diagnosi di AIE. Per le caratteristiche di elevata specificità, l'AGID rimane quello prescritto dall'OIE ai fini degli scambi internazionali. Tuttavia, tale metodo, anche se in un numero limitato di casi, classifica alcuni campioni come falsi negativi, a causa della sua modesta sensibilità (1). Inoltre, la lettura di questa prova richiede esperienza dell'operatore, soprattutto per i sieri debolmente positivi, di difficile interpretazione. È stato infatti osservato nel corso di prove interlaboratorio, che la percentuale di errore di interpretazione di un siero debolmente positivo in ELISA e in AGID, era rispettivamente pari a 1,5% ed a 80%.

Da oltre 20 anni, anche per la diagnosi sierologica di AIE sono disponibili numerosi kit ELISA, dichiarati dai produttori come di pari o maggiore sensibilità rispetto all'AGID. Alla luce dell'esperienza maturata nel corso degli anni di sorveglianza, il Centro di Referenza per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) ha più volte raccomandato, ai fini dello screening sierologico l'impiego del proprio kit ELISA, validato secondo i criteri definiti dall'OIE.

Considerata la disponibilità di più kit ELISA in Italia, parallelamente al circuito interlaboratorio AGID/ELISA del 2012, con la collaborazione di alcuni laboratori degli Istituti Zooprofilattici, si è proceduto ad un confronto preliminare di alcune caratteristiche diagnostiche ed ad una valutazione della precocità dei kit effettuata presso il CRAIE, per un loro possibile impiego nella sierodiagnosi di AIE.

MATERIALI E METODI: In questo lavoro sono state confrontate quattro ELISA commerciali e due in-house. I kit utilizzati sono i seguenti:

VMRD EIA Virus Antibody kit

Un kit in-house messo a punto dal Dipartimento di Produzioni Ani-

mali, Epidemiologia ed Ecologia (DPAEE) della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino e validato (2).

IDEXX Herd Chek® EIA cELISA

IDVET ID Screen © Equine Infectious Anemia Double Antigen

Un kit in-house prodotto e validato (2) dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana (IZSLT)

SYNBIOTICS ViraCHEK®/EIA Test Procedure

Ai kit è stato attribuito un numero casuale da 1 a 6. Dei 6 kit, i numeri 1 e 3 sono ELISA di tipo competitivo e gli altri sono ELISA indirette. L'antigene utilizzato è la sola p26 per i kit 1, 2, 3, 4, 6, mentre il kit 5 impiega una proteina ricombinante contenente epitopi antigenici della p26 della gp45.

Sono stati coinvolti dieci laboratori. A ciascuno sono stati inviati i kit ed un pannello costituito da 11 sieri positivi in doppia aliquota ed un siero negativo in otto aliquote. Il pannello era stato allestito da 12 sieri di collezione, utilizzati a varie diluizioni, preventivamente testati con tutti i kit per ottenere un risultato atteso. Le aliquote dei pannelli avevano una numerazione (da 1 a 30) diversa per laboratorio.

Ai laboratori è stato chiesto di effettuare una prova per kit, inserendo le densità ottiche (DO) ottenute in un foglio Excel®. Per valutarne la precocità rispetto alla positività sierologica, i diversi kit sono stati testati dal CRAIE con 96 sieri, prelevati a 0, 14, 21 e 28 giorni (T) p.v. a 24 animali immunizzati sperimentalmente con diversi virus, vivi attenuati, presso il Gluck Center for Equine Diseases (Kentucky, USA).

I risultati delle ELISA sono stati confrontati anche con i risultati in AGID (3) per tutti i sieri impiegati.

Un laboratorio non ha riportato i dati per il kit 1; un altro laboratorio, per il kit numero 6 ha riportato la lettura ottica non confrontabile con quelle degli altri laboratori; pertanto per alcuni parametri questi dati non sono stati inclusi e le elaborazioni sono state effettuate su nove laboratori.

I dati sono stati analizzati valutando l'accuratezza qualitativa, stimata attraverso Dse, Dsp, il K di Cohen per i kit con solo 2 categorie di esito (positivo/negativo) e il K pesato di Cohen per i kit con 3 categorie (positivo/dubbio/negativo).

Considerando sia le caratteristiche qualitative che semi-quantitative del test ELISA, sono state stimate l'accordanza tra le due aliquote dello stesso siero ai fini della ripetibilità e, ai fini della riproducibilità, sono stati stimati la concordanza ed il CV di ogni siero, complessivamente per kit e per tutti i laboratori. Per maggiori dettagli riguardanti il calcolo di questi parametri si rimanda alla bibliografia (4, 5 e 6).

RISULTATI E CONCLUSIONI: In tabella 1 sono mostrati i risultati riguardanti la valutazione della precocità di rilevamento della positività sierologica. I risultati a T0 e T14 non sono riportati perché negativi con tutti i kit. Il kit che ha dimostrato maggiore precocità è stato il 5 che, già al giorno 21 p.v, ha individuato 9 sierii come positivi, mentre 1 e 4 ne hanno individuato solo uno e gli altri nessuno. Al giorno 28, il kit 5 ha riconosciuto n = 20 sierii positivi e n=1 dubbio; il kit 1 ha individuato n=16 positivi e n=2 dubbi, il kit 3 n = 15 ierii positivi; il kit 6 n = 14 positivi; il kit 4 n = 12 positivi e 1 dubbio e il kit 2 n = 10 positivi. Tutti i kit hanno mostrato un accordo perfetto secondo la griglia di valutazione proposta (7), con il 2 e il 4 che hanno mostrato un accordo con l'atteso pari ad 1. Per quanto riguarda la DSp, tutti i kit hanno mostrato un valore del 100%; per la DSe, i kit 2 e 4 hanno mostrato un valore del 100%, gli altri un valore maggiore di 97% (tabella 2. I kit 2 e 4 hanno mostrato una concordanza pari ad 1 per tutti i sierii. L'accordanza degli altri kit è risultata sempre maggiore o uguale a 0,81 (tabella 3). Solo per i sierii 6, 7 e 11 la concordanza totale per ogni siero tra tutti i kit e tutti i laboratori è risultata diversa da 100 (tabella 4). n tabella 5 sono mostrati i CV totali per siero per ogni kit tra tutti i laboratori. Per i kit 1 e 3, di natura competitiva, il CV è stato calcolato non sui valori di

DO, come per gli altri kit, ma sulla differenza tra 100 e il rapporto percentuale tra DO e media del controllo negativo. Inoltre, per gli stessi kit, i CV dei sierii negativi, anche se riportati in tabella non sono valutabili. Tutti i kit, eccetto il 6, hanno mostrato per i sierii positivi un CV soddisfacente, in quanto inferiore al 20%, mentre il kit 6 ha mostrato dei CV superiori (tra 15 e 47%). Confrontando i risultati in ELISA ed in AGID, tutti i kit si sono mostrati più sensibili e più precoci del test di conferma.

Sulla base dei risultati ottenuti per i parametri valutati possiamo affermare che tutti i kit hanno una sensibilità maggiore dell'AGID ed una pari specificità limitatamente al numero di sierii sottoposti alle prove di performance. Pertanto si possono ritenere idonei all'utilizzo e preferibili al metodo qualitativo di riferimento come test di screening nella sorveglianza attiva e nella diagnosi sospetta di AIE. Nonostante alcuni kit abbiano ottenuto performance migliori, soprattutto in termini di precocità, la scelta del prodotto da parte dei laboratori dovrebbe tenere conto anche di valutazioni di altri parametri fra i quali: costo per analisi, praticità, tempi di esecuzione e categorizzazione dell'esito.

Si auspica inoltre per tutti anche una validazione completa, con criteri uniformi e riconosciuti a livello internazionale (2).

SIERII	1	2	3	4	5	6	AGID
T21 SIERO 1	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 2	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 3	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 4	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 5	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 6	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 7	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 8	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 9	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 10	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 11	+	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 12	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 13	-	-	-	+	+	-	-
T21 SIERO 14	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 15	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 16	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 17	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 18	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 19	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 20	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 21	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 22	-	-	-	-	+	-	-
T21 SIERO 23	-	-	-	-	-	-	-
T21 SIERO 24	-	-	-	-	-	-	-
SIERII	1	2	3	4	5	6	AGID
T28 SIERO 1	-	-	-	-	+	-	-
T28 SIERO 2	-	-	-	-	-	-	-
T28 SIERO 3	+	-	+	-	+	+	-
T28 SIERO 4	+	+	+	+	+	+	-
T28 SIERO 5	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 6	+	+	+	+	+	+	-
T28 SIERO 7	-	-	-	+	+	-	-
T28 SIERO 8	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 9	+	-	+	-	+	+	+
T28 SIERO 10	+	-	+	-	+	-	-
T28 SIERO 11	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 12	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 13	+	-	+	+	+	+	-
T28 SIERO 14	+	+	+	+	+	+	-
T28 SIERO 15	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 16	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 17	DUBBIO	-	-	-	+	+	-
T28 SIERO 18	+	-	-	-	+	-	-
T28 SIERO 19	-	-	-	-	-	-	-
T28 SIERO 20	-	-	-	-	+	-	+
T28 SIERO 21	-	-	-	-	-	-	-
T28 SIERO 22	+	+	+	+	+	+	+
T28 SIERO 23	+	-	+	DUBBIO	+	-	-
T28 SIERO 24	DUBBIO	-	-	-	DUBBIO	-	-

Tabella 1: valutazione della precocità rispetto alla positività sierologica su sierii di animali immunizzati

PARAMETRO	KIT					
	1	2	3	4	5	6
K di COHEN	0,996	1,00	0,984	1,00	0,976	0,976
SENSIBILITÀ	99,49	100	97,98	100	98,99	98,48
SPECIFICITÀ	100	100	100	100	100	100

Tabella 2: risultati del K di Cohen, DSe e DSp per i 6 kit

KIT	1	2	3	4	5	6
SIERO 1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
SIERO 3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
SIERO 5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
SIERO 8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SIERO 11	0,90	1,00	0,81	1,00	0,81	1,00
SIERO 12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabella 3: risultati dell'accordanza totale per kit per siero

Concordanza	
1	100,00
2	100,00
3	100,00
4	100,00
5	100,00
6	89,41
7	98,13
8	100,00
9	100,00
10	100,00
11	75,67
12	100,00

Tabella 4: risultati della concordanza per sieri per tutti i kit e tutti i laboratori

KIT	1	2	3	4	5	6
SIERO1	1,44	14,50	3,65	21,48	20,54	33,83
SIERO 2	0,98	13,70	3,74	13,99	19,03	32,02
SIERO 3	1,39	14,66	5,29	14,64	21,41	33,62
SIERO 4	1,65	15,34	4,62	20,31	19,29	29,42
SIERO 5	0,82	15,59	5,18	26,33	19,42	31,37
SIERO 6	1,87	19,52	9,59	31,10	24,80	42,01
SIERO 7	1,54	14,48	4,75	15,69	21,40	29,88
SIERO 8	1,16	13,82	4,35	14,25	23,08	33,93
SIERO 9	1,46	18,69	4,19	14,49	24,80	29,95
SIERO 10	1,28	15,67	3,81	16,18	20,54	33,21
SIERO 11	18,74	23,63	6,76	13,09	32,98	47,44
SIERO 12	108,96	20,42	-312,69	79,68	20,27	15,20

Tabella 5: risultati di CV per siero e per kit calcolato sulle DO eccetto che per i kit 1 e 3 per i quali è stato calcolato sulla percentuale di inibizione

BIBLIOGRAFIA: 1. Issel CJ et al. 1993 "A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia" *J Vet Diagn investigation* ;5 ; pp137-141
 2. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012 Chapter 1.1.5.*
 3. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012 Chapter 2.5.6*
 4. S.D. Langton et al; 2002; "Analysing collaborative trials for

qualitative microbiological methods: accordance and concordance", International Journal of Food Microbiology; 79 175-181
 5. <http://www.dsa.unipr.it/soliani/soliani.html>
 6. P. Quatto; 2004; "Un test di concordanza tra più esaminatori"; *Statistica*; 64; 1;145-151
 7. J. Richard Landis e Gary G. Koch; 1977 "The measurement of observer agreement for categorical data" *Biometrics*; 33;159-174.