

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana
Sede Centrale ROMA
Via Appia Nuova 1411 – 00178 ROMA (Capannelle)

CENTRO REFERENZA NAZIONALE Anemia Infettiva Equina (CRAIE)

RISULTATI
CIRCUITO INTERLABORATORIO
per Anemia Infettiva Equina (AIE)
Anno 2012



ENTE ORGANIZZATORE: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA -
SEDE CENTRALE DI ROMA
Centro Referenza Nazionale
Anemia Infettiva Equina
E-mail: **centroreferenzaaie@izslt.it**

Responsabile Dott. Gian Luca Autorino
E-mail: **gianluca.autorino@izslt.it**

GRUPPO DI LAVORO: Dott.ssa Scicluna Maria Teresa
E-mail: **teresa.scicluna@izslt.it**
Dott. Nardini Roberto
E-mail: **roberto.nardini@izslt.it**
Dott. Frontoso Raffaele
E-mail: **raffaele.frontoso@izslt.it**

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

SCOPO DEL CIRCUITO

La realizzazione del Circuito Interlaboratorio (CI) serve a valutare la competenza tecnica dei singoli laboratori per la sierodiagnosi di AIE.

In relazione alla possibile presenza di sieri debolmente positivi, di non facile interpretazione in AGID, l'esecuzione della prova anche in ELISA è stata inserita facoltativamente per dimostrare la differente sensibilità delle due tecniche e i possibili effetti sul piano di sorveglianza.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI SIERO

I campioni di siero scelti per il presente CI sono stati allestiti a partire da sieri equini di collezione disponibili presso il CRAIE.

Per ogni campione di siero selezionato è stato preparato un idoneo volume, poi suddiviso in aliquote per la costituzione dei pannelli e per i controlli di qualità (test di omogeneità e stabilità); i sieri sottoposti con esito favorevole a tali prove sono stati successivamente distribuiti ai singoli laboratori partecipanti.

CONTROLLO DI QUALITÀ DEI CAMPIONI DI SIERO

I sieri selezionati per il CI sono stati sottoposti ai test di omogeneità e di stabilità.

Test di omogeneità:

1. Ogni campione di siero è stato suddiviso in aliquote.
2. Ogni aliquota è stata esaminata 10 volte in AGID (metodo OIE e Test di Coggins).
3. La lettura del test è stata eseguita dopo 24 e 48 ore di incubazione.
4. Gli stessi sieri sono stati esaminati con tutti i kit ELISA disponibili in commercio e con l'ELISA "in house" del IZS LT.

Test di stabilità:

1. I sieri sono stati conservati a 37 ± 1 °C ed a -20 ± 5 °C.
2. Le prove sono state eseguite a distanza di 15 gg.
3. La lettura del test è stata eseguita dopo 24 e 48 ore di incubazione.

I pannelli sono stati esaminati con tutti i kit ELISA disponibili in commercio e con l'ELISA "in house" dell'IZSLT.

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

Ogni pannello era costituito da 30 aliquote di siero, allestiti da 11 sieri equini di collezione disponibili presso il CRAIE. Ogni siero era presente in doppio, attribuendogli casualmente due numeri unici, compresi tra 1 e 30. Per i campioni negativi è stato utilizzato un siero equino negativo GIBCO®. In tabella 1 è mostrato il riepilogo dei 15 sieri con la diluizione d'uso, il risultato atteso in AGID e i numeri casuali attribuiti per il loro identificativo da parte del CRAIE .

Tabella 1: Riepilogo dei sieri utilizzati per il circuito interlaboratorio

N° SIERO	DILUIZIONE D'USO	RISULTATO ATTESO IN AGID	NUMERI ATTRIBUITI NEL PANNELLO	
1	1/4	SP	4	10
2	1/8	SP	24	27
3	1/5	MP	20	11
4	1/4	MP	30	7
5	1/20	MP	9	17
6	1/3	WP	13	8
7	1/18	WP	12	25
8	1/10	WP	1	14
9	1/15	WP	21	2
10	1/25	WP	18	26
11	1/120	WP/N	19	28
12	Tal Quale (TQ)	N	22	5
13	TQ	N	3	15
14	TQ	N	6	29
15	TQ	N	16	23

Il risultato atteso è stato espresso secondo una scala di positività: WP(weak positive), MP(medium positive) ed SP (strong positive). Ai laboratori è stato richiesto di inserire un risultato dicotomico (positivo/negativo); la classificazione secondo scala di positività è utile al fine di valutare quale classe di reattività crei problemi di corretta identificazione.

Il siero numero 11, da cui sono stati creati i sieri 19 e 28, è un siero a bassa reattività in AGID ma con chiara reattività in ELISA. Nella valutazione dei risultati della tecnica AGID (metodo Coggins e OIE) i risultati riguardanti questo siero

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

non sono stati considerati; mentre per la valutazione della tecnica ELISA, effettuata facoltativamente, sono stati presi in considerazione.

VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Per l'analisi statistica è stata valutata la concordanza mediante il calcolo del K di Cohen e del K multiplo, per AGID (metodo OIE e Coggins) ed ELISA **separatamente.**

La valutazione della competenza tecnica dei laboratori è stata effettuata esclusivamente in relazione ai risultati della prova di immunodiffusione, fatto salvo per i laboratori che hanno espressamente richiesto di eseguire unicamente la tecnica ELISA.

Il kappa 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.

La formula proposta da Cohen 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 la valutazione del laboratorio è stata utilizzata la griglia di valutazione del valore di K proposta da J. Richard Landis e Gary G. Koch (The measurement of observer agreement for categorical data pubblicato da Biometrics, Vol. 33, pp.159-174 – 1977), di seguito riportata in tabella 2.

Tabella 2: Griglia di valutazione della concordanza

Kappa	Concordanza
< 0.00	Scarsa
0.00-0.20	Leggera
0.21-0.40	Discreto
0.41-0.60	Moderato
0.61-0.80	Sostanziale
0.81-1.00	Quasi perfetto

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

I laboratori potranno valutare la propria attività secondo i seguenti criteri:

K < 0.81	Insoddisfacente
K ≥ 0.81	Soddisfacente

Per valutare la variabilità intra- ed interlaboratorio sono stati valutati anche i parametri di **accordanza** e **concordanza** secondo quanto proposto da Langton.

L'**accordanza** è l'equivalente qualitativo della ripetibilità ed è definita come la probabilità che un campione, analizzato in doppio, sotto condizioni di ripetibilità, dia lo stesso risultato qualitativo; indipendentemente dal risultato atteso.

Riassumendo brevemente il metodo utilizzato, possiamo dire che l'accordanza è 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

utilizzando la formula:

$$C = \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

C= numero di combinazioni possibili

n= numero di risultati

k= numero di risultati per ogni combinazione

La **concordanza** è, per i dati qualitativi, l'equivalente della riproducibilità ed è definita come la probabilità che lo stesso campione inviato a due 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. Per il calcolo della concordanza è stato utilizzato il file excel fornito gentilmente da Langton, e sono stati considerati solo i sieri positivi, non essendo possibile analizzare positivi e negativi contemporaneamente.

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

Mettendo in relazione l'accordanza e la concordanza possiamo stimare ulteriormente la variabilità interlaboratorio tramite la formula della **COR** (Concordance Odds Ratio). 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 fortemente dipendenti dalla sensibilità, è utile calcolare il COR, meno influenzata dal livello di sensibilità.

Il valore di COR si calcola mediante la formula seguente:

$$\text{COR} = \frac{\text{Accordanza} * (100 - \text{Concordanza})}{\text{Concordanza} * (100 - \text{Accordanza})}$$

Il valore di COR può essere interpretato come la probabilità relativa di ottenere lo stesso risultato quando un campione è 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 maggiori o minori di 1 indicano rispettivamente una maggiore o minore variabilità interlaboratorio rispetto alla intralaboratorio. Per il calcolo di accordanza e concordanza e COR, gli 8 sieri negativi, provenienti da un'unica fonte, sono stati considerati come un unico siero, denominato siero 12: di questo siero sono state considerate 8 ripetizioni. Rispetto ai due sieri (19,28) non tenuti in considerazione per le valutazioni di idoneità dei laboratori in AGID è stata calcolata la percentuale di identificazione corretta per ogni tecnica utilizzata, al fine di dimostrare la differente sensibilità tra le diverse tecniche e le implicazioni possibili in un piano di sorveglianza che, come sta accadendo in Italia, è molto vicino all'eradicazione della malattia. Nella valutazione della tecnica ELISA sono stati invece considerati 30 sieri totali, in quanto anche i sieri 19 e 28 (siero 11) presentavano una netta positività.

CIRCUITO INTERLABORATORIO per AIE - ANNO 2012

RISULTATI

Tabella 3: Tecnica AGID, metodo Coggins: valori di K rispetto all'atteso per laboratorio

LABORATORIO	K	LABORATORIO	K
1	1	43	0,93
2	1	44	1
3	0,93	45	1
7	0,93	46	1
8	1	47	1
17	1	48	1
18	1	49	1
19	1	50	1
20	1	51	1
22	1	52	1
23	1	53	1
25	0,93	55	1
26	1	56	1
27	1	58	0,93
29	1	59	0,88
30	1	60	1
31	1	61	1
42	1	68	1

Tabella 4: Tecnica AGID, metodo Coggins: numero di laboratori che hanno eseguito il metodo e valore di K multiplo rispetto all'atteso

N° LAB	K MULTIPLO
36	0,99

Tabella 5: Tecnica AGID, metodo OIE: valori di K rispetto all'atteso per laboratorio

LABORATORIO	K	LABORATORIO	K
1	1	49	1
2	1	51	1
3	0,93	52	1
4	1	53	1
5	1	54	1
8	1	55	1
7	0,93	56	1
10	1	57	1
11	1	58	1
12	1	59	0,87
14	1	60	1
15	1	61	1
16	1	62	1
26	1	63	1
33	0,93	64	1
34	1	65	1
35	0,93	66	1
37	1	68	1
40	1	69	0,93
41	1	70	1

Tabella 6: Tecnica AGID, metodo OIE: numero di laboratori che hanno eseguito il metodo e valore di K multiplo rispetto all'atteso

N° LAB	KMULTIPLO
40	0,99

Tabella 7: Tecnica ELISA : valori di K rispetto all'atteso per laboratorio

LABORATORIO	K	LABORATORIO	K
1	1	44	1
2	1	45	1
4	1	46	1
5	1	47	1
6	1	48	1
7	1	49	1
20	1	50	1
33	1	53	1
34	1	54	1
35	1	55	1
37	1	56	1
38	1	58	1
39	1	59	1
40	1	60	1
41	1	61	1
42	0,93	62	1
43	1	68	1

Tabella 8: Tecnica ELISA : numero di laboratori che hanno eseguito il metodo e valore di K multiplo rispetto all'atteso

N° LAB	K MULTIPLO
33	0,998

Tabella 9: Tecnica AGID, metodo Coggins: valori di accordanza per ogni siero dei soli laboratori con accordanza diversa da uno

SIERO	LABORATORIO				
	3	7	25	43	58
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1
6	1	0	0	0	0
7	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1
11	1	1	0	1	1
12	0,82	1	1	1	1

Tabella 10: Tecnica AGID, metodo Coggins: accordanza media tra tutti i laboratori per ogni siero

SIERO	MEDIA
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	0,89
7	1
8	1
9	1
10	1
11	0,97
12	0,995

Tabella 11: Tecnica AGID, metodo OIE: valori di accordanza per ogni siero dei soli laboratori con accordanza diversa da uno

SIERO	LABORATORIO									
	3	7	10	33	35	51	55	58	59	69
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
11	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
12	0,87	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabella 12: Tecnica AGID, metodo OIE: accordanza media tra tutti i laboratori per ogni siero

SIERO	MEDIA
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	0,875
7	1
8	1
9	1
10	0,95
11	0,9
12	0,997

Tabella 13: Tecnica ELISA: valori di accordanza per ogni siero dei soli laboratori con accordanza diversa da uno

	LABORATORIO
SIERO	42
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	1
7	1
8	1
9	1
10	1
11	0
12	1

Tabella 14: Tecnica ELISA: accordanza media tra tutti i laboratori per ogni siero

SIERO	MEDIA
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	1
7	1
8	1
9	1
10	1
11	0,97
12	1

Tabella 15: Tecnica AGID, metodo Coggins : concordanza tra i laboratori e COR tra tutti i laboratori per i sieri positivi

	Bootstrap 99% limits			
	Estimate	Bootstrap s.e.	lower	upper
Concordance (percentage)	98,1%	0,94%	95,11%	100,00%
COR	1,04		0,988	1,115

Tabella 16: Tecnica AGID, metodo OIE: concordanza tra i laboratori e COR tra tutti i laboratori per i sieri positivi

	Stima	S.e.	Limite inferiore	Limite superiore
Concordance (%)	98,3	0,68	96,31	99,75
COR	1,01		0,988	1,04

Tabella 17: Tecnica ELISA, concordanza tra i laboratori e COR tra tutti i laboratori per i sieri positivi

	Stima	S.e.	Limite inferiore	Limite superiore
Concordance (%)	99,7	0,27	98,90	100,00
COR	1,00		0,9956914	1

Tabella 18: Siero 11, valori assoluti e percentuali delle identificazioni corrette ed errate per tecnica e metodo.

TECNICA AGID	Totale osservazioni	Non correttamente identificati	Correttamente identificati	Non correttamente identificati (%)	Correttamente identificati (%)
METODO COGGINS	72	58	14	80,56	19,44

TECNICA AGID	Totale osservazioni	Non correttamente identificati	Correttamente identificati	Non correttamente identificati (%)	Correttamente identificati (%)
METODO OIE	80	63	17	78,75	21,25

TECNICA ELISA	Totale osservazioni	Non correttamente identificati	Correttamente identificati	Non correttamente identificati (%)	Correttamente identificati (%)
	66	1	65	1,52	98,48

CONCLUSIONI

In tabella 19 è riassunta la distribuzione di K per ogni tecnica e metodo sia in termini assoluti che percentuali.

Tabella 19: distribuzione di K per ogni tecnica e metodo sia in termini assoluti che percentuali

	NUMERO LAB	K=1	K=0,93	K=0,88
COGGINS	36	30	5	1
OIE	40	33	6	1
ELISA	33	32	1	0
	NUMERO LAB	K=1(%)	K=0,93(%)	K=0,88(%)
COGGINS	36	83,33	13,89	2,78
OIE	40	82,50	15	2,5
ELISA	33	96,97	3,03	0

Tutti i laboratori hanno ottenuto una valutazione ritenuta soddisfacente per tutte le tecniche utilizzate. I valori di K multiplo sono risultati di 0,99 per entrambi i metodi AGID e di 0,998 per la tecnica ELISA.

I valori di accordanza e concordanza medie sono ritenuti molto soddisfacenti, le accordanze per singolo laboratorio, essendo state inviate solo due repliche di ogni, hanno un significato relativo, in quanto oscillano da 0 a 1 senza valori intermedi.

In particolare le identificazioni errate sono le seguenti:

- Il **LAB3** ha identificato come positivo il siero 22 (N), con entrambe le tecniche AGID; per quanto è molto probabile che sia dovuto ad un errore di compilazione della scheda, il ring test è utile anche a verificare l'incorrenza in errori di questo tipo, suggeriamo quindi al suddetto laboratorio maggiore attenzione al momento dell'inserimento dei risultati.
- In Agid metodo Coggins il siero 13 (WP) è stato identificato come negativo dai **LAB 7, 25, 43, 58, 59**; il siero 8 è stato identificato come negativo dal **LAB 59**.
- In Agid metodo OIE il siero 13 (WP) è stato identificato come negativo dai **LAB 7, 33, 35, 58, 59**; il siero 8 (WP) è stato identificato come negativo dal **LAB 59**; il siero 18 (WP) è stato identificato come negativo dal **LAB 69**.
- In ELISA il siero 28 (WP/N, dil 1/25) è stato identificato come negativo dal **LAB 42**.

Tutti i sieri non correttamente identificati erano stati classificati come reattività WP. Complessivamente, assieme all'analisi dei risultati sul siero 11, si evidenzia che la percentuale di errore in ELISA sia solo del 1,52% al fronte di una errata identificazione in AGID dell' 80% .

I risultati pertanto confermano quanto già in passato richiamato, circa la necessità di reclutare il maggior numero di soggetti positivi adottando **COME METODO DI SCREENING**, in ambito di sorveglianza nazionale e diagnostica corrente, **IL TEST ELISA**, dotato di caratteristiche di maggiore

standardizzazione, maggiore sensibilità ed oggettività di lettura rispetto alla tecnica qualitativa di AGID.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

D.M. 04/12/1976 – Profilassi dell'Anemia Infettiva degli Equini. Pubblicato sulla G.U. del 31.12.1976 n.348.

“Equine Infectious Anaemia” in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, 2008; Part 2, Section 2.5, Chapter 2.5.6 (pagg. 866-870).

G.U. n. 66 del 21-3-2005 “Comunicato relativo alle metodologie diagnostiche per le malattie degli equidi riproduttori maschi ai fini della disciplina della riproduzione animale”

International Journal of Food Microbiology 79 (2002) 175-181. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. S.D. Langton, R. Chevennement, N. Nagelkerker, B. Lombard

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., 1998, 17 (2), 600-609.

Guida ISO/IEC 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.

Guida ISO/IEC 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.

Linea guida ILAC-G13: 08/2007 Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes.

S.D. Langton et al” Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance”,International Journal of Food Microbiology 79 (2002) 175-181