



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana**



**Relazione su:  
Confronto tra le metodiche ELISA  
disponibili in Italia per la sierodiagnosi di  
Anemia Infettiva Equina  
08/05/2013**

**Redatto da: Gian Luca Autorino, Maria Teresa Scicluna, Roberto Nardini**

---

<b>INDICE</b>	
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALI, METODI E RISULTATI</b>	<b>4</b>
Kit elisa impiegati	5
Laboratori partecipanti	6
Pannello di sieri e prove eseguite	6
<b>VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES</b>	<b>7</b>
<b>Accuratezza</b>	<b>7</b>
Sensibilità e specificità	8
K di Cohen	8
K di Cohen pesato (3 categorie)	9
K multiplo	10
Interpretazione del valore di K	10
<b>Ripetibilità e riproducibilità</b>	<b>10</b>
Coefficiente di variazione	10
Accordanza	11
Concordanza secondo Langton e COR	12
Concordanza secondo Langton	12
COR (Concordance odds ratio)	13
K totale secondo Quatto non confrontato con l'atteso	14
Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti	14
Questionari di valutazione	16
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>20</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>21</b>
<b>Accuratezza</b>	<b>21</b>
Sensibilità e specificità	21
K di Cohen	21
K multiplo	22
<b>Ripetibilità e riproducibilità</b>	<b>22</b>
Coefficiente di variazione	22
Accordanza	22
Concordanza secondo Langton	23
COR (Concordance odds ratio)	23
K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto	23
Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti	23
Questionari di valutazione	24
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>27</b>
<b>APPENDICI</b>	<b>30</b>
<b>APPENDICE I: Sensibilità e specificità</b>	<b>31</b>
<b>APPENDICE II :Coefficiente di variazione</b>	<b>32</b>
<b>APPENDICE III: Accordanza</b>	<b>34</b>
<b>APPENDICE IV: Concordanza</b>	<b>36</b>
<b>APPENDICE V: Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti</b>	<b>37</b>
<b>APPENDIVE VI: Questionari di valutazione</b>	<b>39</b>

---

# **INTRODUZIONE**

Dal 2006, l'Italia attua un piano nazionale di sorveglianza per Anemia Infettiva Equina (AIE) [1; 2; 3] che prevede un controllo sierologico di tutta la popolazione equina, ad eccezione degli animali allevati esclusivamente per la produzione di alimenti. I soggetti confermati positivi devono essere abbattuti o isolati rispettando norme di biosicurezza volte ad evitare la trasmissione dell'infezione.

La diagnosi sierologica di questa infezione, secondo il D.M. 4/12/1976, deve essere effettuata dagli IZZSS competenti territorialmente e confermata dal Centro di Referenza Nazionale. Il test di conferma è l'immunodiffusione in gel di Agar (AGID), come da descritto da Coggins [4; 5]. Altre tecniche di conferma contemplate dal manuale WOAHP sono l'ELISA, la PCR e l'Immunoblotting.

L'AGID ricerca anticorpi contro le strutture antigeniche del virus, le cui principali sono la p26 la gp45 e gp90; l'antigene comunemente utilizzato nei diversi kit AGID (commerciali e non) è la p26, in quanto questa proteina capsidica è altamente conservata nei diversi stipiti virali. Tuttavia, tale metodo, in percentuali che raggiungono anche il 17%, classifica alcuni sieri come falsi negativi [6]. La sua modesta sensibilità è dovuta sia alla difficile standardizzazione del metodo che alla presenza di "weak responders" (soggetti che reagiscono sempre in maniera debole) e di animali nella fase iniziale di infezione. Studi effettuati presso il CRAIE hanno dimostrato che l'AGID presenta un Limite di Rilevabilità (Limit of Detectability; LOD) di 0,9 Log<sub>10</sub> minore rispetto all'ELISA, ciò significa che l'ELISA identifica ancora come positiva una diluizione dieci volte maggiore dell'ultima diluizione che l'AGID riconosce tale. Inoltre, la lettura di questa prova richiede esperienza dell'operatore, soprattutto per 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, 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 della sua maggiore sensibilità l'ELISA può essere utilizzata per lo screening sierologico, inviando alla conferma i campioni positivi da testare in AGID.

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 al confronto 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, METODI E RISULTATI***

**Kit ELISA impiegati**

I kit ELISA disponibili in Italia e utilizzati nel confronto sono i seguenti:

1. *VMRD EIA Virus Antibody kit* ®

ELISA di tipo indiretto che utilizza un antigene p26 ricombinante adsorbito alla piastra ed un antigene p26 ricombinante coniugato con perossidasi per evidenziare la reazione.

2. *IDEXX Herd Chek*® EIA cELISA

ELISA di tipo competitivo che utilizza anticorpi monoclonali contro la p 26 adsorbiti alla piastra ed un antigene p26 coniugato con perossidasi. I sieri ed i monoclonali adsorbiti competono per il legame con l'antigene coniugato. La presenza di anticorpo nel siero in esame sarà svelata dal mancato sviluppo del colore.

3. *IDVET ID Screen* ® *Equine Infectious Anemia Double Antigen*

ELISA di tipo indiretto che utilizza un antigene p26 ricombinante adsorbito alla piastra e lo stesso antigene coniugato con perossidasi per svelare la reazione.

4. *SYNBIOTICS ViraCHEK*®/EIA Test Procedure

ELISA di tipo indiretto che utilizza un antigene ricombinante adsorbito alla piastra e lo stesso antigene coniugato con perossidasi per svelare la reazione.

5. *Kit in-house ELISA CTB* prodotto e validato dal CRAIE [7]

ELISA di tipo competitivo che utilizza un monoclonale anti p26 adsorbito alla piastra, che compete con gli anticorpi sierici per il legame con l'antigene p26 ricombinante. La reazione è svelata da un secondo anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi diretto contro lo stesso antigene p26.

6. *Kit Eradikit EIAV* messo a punto presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Torino e validato [7]

ELISA di tipo indiretto che utilizza antigeni gag ed env ricombinanti. La reazione è svelata da un anticorpo anti IgG di equino marcato con perossidasi.

**Laboratori partecipanti**

Oltre al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini, che ha organizzato il confronto, sono stati coinvolti 10 laboratori di sierologia degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

**Pannello di sieri e prove eseguite**

Il pannello era costituito da 30 sieri di equidi: 11 sieri positivi in doppia aliquota e 8 aliquote di un siero negativo.

I sieri positivi utilizzati derivano da sieri di collezione e da sieri raccolti durante attività di ricerca, utilizzati a varie diluizioni; il siero negativo invece è di tipo commerciale (GIBCO ®). In tabella 1 per ogni siero sono riportate le caratteristiche ed i numeri dei sieri del pannello da esso derivanti. Il pannello è stato analizzato una sola volta per ogni kit ELISA.

Per effettuare una valutazione della precocità rispetto alla positività sierologica in seguito ad infezione, sono stati inoltre analizzati dal CERME, 96 sieri, prelevati a 24 animali immunizzati (0, 14, 21 e 28 giorni p.v.) con diversi virus vivi attenuati, presso il Gluck Center for Equine Diseases (Kentucky, USA).

Per la trasmissione dei risultati, ogni laboratorio ha inviato un foglio Excel, appositamente predisposto e fornito dal CERME, su cui erano stati trascritti i valori di densità ottica di ciascuna prova. Il foglio automaticamente riportava come output se i criteri di validazione per ogni kit fossero stati o meno rispettati.

Il laboratorio dell'IZS di Padova non ha riportato i risultati riguardanti il kit CTB.

Il laboratorio dell'IZS di Torino ha riportato per il kit IDVET dei risultati non confrontabili con quelli degli altri laboratori, pertanto è stato escluso dalla valutazione dei coefficienti di variazione (CV) per questo kit.

## MATERIALI, METODI E RISULTATI

Tabella 1: Sieri utilizzati per la formazione del pannello. Per ogni siero è indicato il numero (1-12); la categoria (SP: strong positive; MP: medium positive; WP: weak positive; N: negativo); l'identificazione, la diluizione e i due sieri derivanti.

Numero	Categoria	Identificazione	Diluizione	Sieri del pannello	
1	SP	09P07	1/4	4	10
2	SP	MULO 10 "9 CLU"	1:8	24	27
3	MP	MULO 2 "9 CLU"	1/5	20	11
4	MP	MULO 7 "9 CLU"	1/4	30	7
5	MP	MULO 10 "9 CLU"	1/20	9	17
6	WP	MULO 1 "9 CLU"	1/3	13	8
7	WP	MULO 10 "9 CLU"	1:18	12	25
8	WP	MULO 7 "9 CLU"	1/10	1	14
9	WP	MULO 9 "9 CLU"	1:15	21	2
10	WP	MULO 9 "9 CLU"	1:25	18	26
11	WP	MULO 9 "9 CLU"	1:120	19	28
12	N	GIBCO	TQ	22	5
	N	GIBCO	TQ	3	15
	N	GIBCO	TQ	6	29
	N	GIBCO	TQ	16	23

### VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES

Un kit ELISA può essere valutato sia sotto il punto di vista qualitativo, quindi sulla base dei risultati categorici che esprime (positivo, negativo e talvolta dubbio); sia sotto il punto di vista quantitativo, valutando la grandezza che misura, in questo caso la densità ottica.

#### ✧ **Accuratezza**

Secondo Langton et al. [8] l'accuratezza qualitativa si stima attraverso la specificità (Sp) e la sensibilità (Se).

L'accuratezza è stata valutata anche mediante il K di Cohen, il K di Cohen pesato e il K multiplo di Cohen [9] di tutti i laboratori, confrontando gli esiti ottenuti con quelli attesi. I kit valutati hanno una categorizzazione dei risultati o dicotomica (VMRD ®; IDEXX ® e Synbiotics ®) o a tre categorie, comprendendo il dubbio (IDVet ®; Kit in-house ELISA CTB e Kit Eradikit EIAV). Al fine di valutare la concordanza dei risultati ricevuti con quelli attesi, è stato utilizzato il K di Cohen per i kit che riportavano solo due categorie, negativo e positivo, mentre per i kit con tre categorie è stato utilizzato il K pesato di Cohen.

**Sensibilità e specificità**

La Se e la Sp misurano la capacità di un kit di identificare in modo corretto rispettivamente i positivi ed i negativi. In questo confronto la Se e la Sp sono stati calcolati paragonando i risultati ottenuti per ogni kit con quelli attesi, come mostrato in tabella 2 e nelle formule sottostanti:

Tabella 2 : Tabella 2X2 utilizzata per il calcolo dei valori di sensibilità e specificità

	<b>Positivi attesi</b>	<b>Negativi attesi</b>
<b>Positivi ottenuti</b>	a	b
<b>Negativi ottenuti</b>	c	d

$$Se = a/(a+c)$$

$$Sp = d/(b+d)$$

In tabella 3 sono riportati i valori di Se ed Sp di ciascun kit calcolati su tutti i laboratori. In appendice I sono mostrati i valori di K di ogni laboratorio per kit.

Tabella 3. Valori di sensibilità e specificità calcolati su tutti i laboratori

	<b>Se</b>	<b>Sp</b>
<b>CTB</b>	99,5	100
<b>ERADIKIT</b>	99,09	100
<b>IDEXX</b>	98,18	100
<b>IDVET</b>	100	100
<b>VMRD</b>	100	100
<b>SYNBIOTICS</b>	98,63	100

**K di Cohen**

Il K di Cohen rispetto ad una proporzione di concordanza semplice (numero di concordi sul totale) ha il vantaggio di depurare il K dall'effetto del caso. Infatti il K è definito come riportato nella formula seguente:

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Dove  $P_o$  è la proporzione di concordi sul totale e  $P_e$  la proporzione attesa per effetto del caso. Nella tabella 6 è esemplificato il confronto tra due osservatori.  $P_o$  in questo caso è la somma di  $a/N$  e  $b/N$  (i risultati concordi tra i due osservatori) e  $P_e$  è dato dalla somma dei prodotti dei totali marginali delle caselle dei concordi. Nell'esempio della tabella sottostante  $P_e = [(a+b/N)*(a+c/N)] + [(c+d/N)*(b+d/N)]$ ; il

## MATERIALI, METODI E RISULTATI

primo prodotto è il  $P_e$  per i concordi positivi e il secondo il  $P_e$  per i concordi negativi. Lo stesso metodo si applica ad M categorie.

Tabella 4: Esempio di tabella di contingenza per il confronto tra due osservatori

	Positivi osservatore A	Negativi osservatore A	
Positivi osservatore B	a/N	b/N	a+b/N
Negativi osservatore B	c/N	d/N	c+d/N
	a+c/N	b+d/N	1

### K di Cohen pesato (3 categorie)

Il K pesato tiene in considerazione anche di quanto il risultato sia lontano dall'atteso, attribuendogli un peso proporzionalmente decrescente, ed ovviando così al problema del K non pesato di considerare totalmente discordi i risultati che in realtà sono molto vicini all'atteso. In tabella 5 sono mostrati i pesi con cui è stato calcolato il K.

Tabella 5: Valori dei pesi assoluti utilizzati in questo studio per il calcolo del K di Cohen pesato

Pesi assoluti statistica k pesata			
	N	D	P
N	1	0,33	0
D	0,33	1	0,33
P	0	0,33	1

In tabella 6 sono riportati i valori di K (di Cohen o pesato a 3 categorie a seconda del kit) per ogni laboratorio

Tabella 6: Valori di K per ciascun kit e per ciascun laboratorio

LAB	1	2	3	4	5
CTB	1	1	1	-	<b>0,95</b>
ERADIKIT	1	1	1	1	<b>0,88</b>
IDEXX	1	1	1	1	1
IDVET	<b>0,84</b>	1	1	1	1
VMRD	1	1	1	1	1
SYNBIOTICS	1	1	1	1	1
LAB	6	7	8	9	10
CTB	1	1	1	1	1
ERADIKIT	1	<b>0,88</b>	1	1	1
IDEXX	1	<b>0,67</b>	1	1	1
IDVET	1	1	1	1	1
VMRD	1	1	1	1	1
SYNBIOTICS	1	<b>0,75</b>	1	1	1

**K multiplo**

Il valore del K multiplo è stato calcolato utilizzando come valori di Po e Pe quelli trovati per il K di Cohen o per il K pesato a 3 categorie, in funzione del kit. Questo valore di K indica quanto, tutti gli esiti di tutti i laboratori siano concordi rispetto all'atteso. Nella tabella 7 sono riportati i valori di K multiplo di ogni Kit esaminato

Tabella 7: Valori di K multiplo per ogni kit

	<b>K MULTIPLO</b>
<b>CTB</b>	0,991
<b>ERADIKIT</b>	0,975
<b>IDEXX</b>	0,952
<b>IDVET</b>	0,976
<b>VMRD</b>	1,000
<b>SYNBIOTICS</b>	0,964

**INTERPRETAZIONE DEL VALORE DI K**

La tabella interpretativa del valore di K adottata in questo confronto è riportata in Tabella 8 [10].

*Tabella 8: Criteri di interpretazione di K proposti da J. Richard Landis e Gary G. Koch*

<b>Kappa</b>	<b>Grado di accordo</b>
<0,00	Scarso
0,00-0,20	Lieve
0,21-0,40	Discreto
0,41-0,60	Moderato
0,61-0,80	Sostanziale
0,81-1,00	Quasi perfetto

✂ **Ripetibilità e riproducibilità**

La valutazione della ripetibilità e della riproducibilità è stata condotta prendendo in considerazione: il CV), l'accordanza, la concordanza e il Concordance Odds Ratio (COR) secondo Langton, e il K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto [11;12].

**Coefficiente di variazione**

Il CV di una serie di dati è dato dal rapporto percentuale tra la sua deviazione standard e la sua media.

In Appendice I sono mostrati tutti i dati relativi al CV. È stato valutato il CV tra:

- le due repliche di ognuno dei 11 sieri positivi, e le 8 repliche del siero negativo all'interno di ogni laboratorio per ogni prova effettuata;

## MATERIALI, METODI E RISULTATI

- tutte le repliche di ciascuno dei 30 sieri considerando globalmente tutti i laboratori.

Il CV è stato calcolato non per la densità ottica, ma per il valore, indicato nella procedura di ogni kit, necessario all'interpretazione del risultato (PI per CTB, S/P per IDVET, reattività per ERADIKIT). Per VMRD e SYNBIOTICS è stato diviso il valore di OD per la media dei positivi, in modo da rendere confrontabili i dati di diversi laboratori. Per IDEXX, che non ha formule di interpretazione, è stato comunque calcolata la percentuale di inibizione, essendo di natura competitiva. Per motivi di chiarezza riportiamo in tabella 9 solo il CV per tutte le repliche e per tutti i laboratori. In appendice II sono riportati i valori di CV suddivisi per kit, per siero e per laboratorio di esecuzione.

*Tabella 9 Valori di Coefficiente di Variazione (CV) per ogni siero per ogni kit considerando tutti i laboratori. Per ciascun kit è stato calcolato il CV sulla variabile necessaria all'interpretazione dei risultati indicata dal foglietto illustrativo. Qualora questa fosse assente è stato calcolato il rapporto tra OD e media del controllo positivo per le ELISA di tipo indiretto e calcolato il rapporto tra OD e media del controllo negativo per le competitive.*

SIERO	SIERI PANNELLO	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS	
1	4	10	1,44	23,73	3,65	21,31	34,86	33,91
2	24	27	0,98	24,25	3,74	17,44	34,56	38,14
3	20	11	1,39	19,42	5,29	17,97	34,75	38,17
4	30	7	1,65	22,19	4,62	17,19	35,87	36,16
5	9	17	0,82	21,67	5,18	30,70	34,34	34,55
6	13	8	1,87	21,02	9,59	30,74	36,10	36,87
7	12	25	1,54	23,64	4,75	18,34	34,04	40,00
8	1	14	1,16	24,94	4,35	18,06	34,99	33,86
9	21	2	1,46	27,18	4,19	18,36	36,02	37,42
10	18	26	1,28	26,52	3,81	18,40	33,71	34,74
11	19	28	18,74	29,20	6,76	15,15	34,50	38,45
12	22,5,3,15,29,6,16,23	108,96	55,27	-312,69	534,31	35,28	52,30	

### Accordanza

Secondo Langton [8], 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 4 (FONTE: <http://it.wikipedia.org/wiki/Combinazione>)

$$C_{n,k} = \frac{n(n-1)(n-2) \cdots (n-k+1)(n-k)!}{k!(n-k)!} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

In Tabella 10 sono mostrati i valori medi di accordanza per ogni siero e per ogni kit. In Appendice III sono mostrate le concordanze per siero per kit e per laboratorio.

Tabella 10: Valori medi di accordanza per ogni siero e per ogni kit

SIERO	SIERI PANNELLO		CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	4	10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	24	27	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
3	20	11	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	30	7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
5	9	17	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00
6	13	8	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00
7	12	25	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
8	1	14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	21	2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	18	26	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	19	28	0,90	0,81	0,81	1,00	1,00	1,00
12	22,5,3,15,29,6,16,23		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

### Concordanza secondo Langton e COR

La riproducibilità qualitativa è stata valutata calcolando la concordanza media per siero secondo quanto proposto da Langton [8]. Mettendo in relazione l'accordanza e la concordanza tramite la formula della COR abbiamo valutato ulteriormente la variabilità interlaboratorio ed intralaboratorio.

### Concordanza secondo Langton

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. In Tabella 11 sono mostrati i valori di concordanza per ogni siero tra tutti i laboratori.

Tabella 11: Valori di concordanza per ciascun siero per kit e tra tutti i laboratori

Siero	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	<b>0,90</b>
5	1,00	1,00	1,00	<b>0,90</b>	1,00	1,00
6	1,00	1,00	<b>0,80</b>	<b>0,90</b>	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	<b>0,90</b>
8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	<b>0,78</b>	<b>0,48</b>	<b>0,80</b>	1,00	1,00	<b>0,80</b>
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

**COR (Concordance odds ratio)**

Possiamo stimare ulteriormente la variabilità tra i laboratori confrontando i valori di accordanza e concordanza. 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 (che comunque nel nostro caso è risultata essere pari al 100%), è utile calcolare il COR, meno influenzata dal livello di sensibilità. Il valore di COR può essere interpretato come la probabilità relativa di ottenere lo stesso risultato quando un campione 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. In Tabella 12 sono mostrati i valori COR per ogni siero tra tutti i laboratori.

## MATERIALI, METODI E RISULTATI

Tabella 12 Valori di Concordance Odds Ratio (COR) per ogni siero e per ogni kit.

COR	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
6	1,00	1,00	1,25	1,00	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	1,16	1,69	1,01	1,00	1,00	1,25
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

### **K totale (secondo Quatto) non confrontato con l'atteso**

In tabella 13 sono mostrati i valori di K considerando tutti i laboratori ed escludendo i laboratori con prove non validabili. Questa concordanza, a differenza delle precedenti, non viene calcolata considerando l'atteso ma stima solo quanto i laboratori siano concordi tra loro nell'espressione dei risultati.

Prendendo in considerazione il valore 0,72, questo risulta, secondo la tabella proposta da *Landis et al.*, interpretabile come accordo sostanziale, indicando quindi una buona riproducibilità.

Tabella 13: Valori di concordanza secondo Quatto per ogni kit e totale

	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS	TOTALE
CONCORDANZA QUATTO	0,95	0,90	0,92	0,96	1,00	0,88	0,94

### **✧ Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti**

Per un'ulteriore valutazione della sensibilità analitica sono stati analizzati 96 sieri di 24 animali sperimentalmente infetti, a vari giorni post-infezione; e 55 sieri di 10 muli naturalmente infetti e immunosoppressi a diversi giorni post-immunosoppressione; anch'essi confrontati con l'AGID e con tutti gli altri kit ELISA disponibili in commercio in Italia. Per la limitata disponibilità dei sieri in oggetto questa valutazione è stata effettuata solo da parte del CRAIE. In Tabella 14 e 15 sono riportati rispettivamente i risultati percentuali di ciascun kit a giorno 21 e 28 p.i. . I

## **MATERIALI, METODI E RISULTATI**

risultati relativi al tempo 0 e al tempo 14 non sono stati riportati in quanto tutti negativi. In Appendice V sono riportati i risultati qualitativi.

Tabella 14: Risultati percentuali dei Kit ELISA su 24 sieri di animali sperimentalmente infetti 21 giorni post infezione.

<b>T21</b>						
<b>SIERI</b>	<b>CTB</b>	<b>ERADIKIT</b>	<b>IDVET</b>	<b>IDEXX</b>	<b>SYMBIOTICS</b>	<b>VMRD</b>
<b>POSITIVI (%)</b>	4,17	37,50	4,17	0	0	0
<b>NEGATIVI (%)</b>	95,83	62,50	95,83	100	100	100

Tabella 15: Risultati percentuali dei Kit ELISA su 24 sieri di animali sperimentalmente infetti 28 giorni post infezione.

<b>T28</b>						
<b>SIERI</b>	<b>CTB</b>	<b>ERADIKIT</b>	<b>IDVET</b>	<b>IDEXX</b>	<b>SYMBIOTICS</b>	<b>VMRD</b>
<b>POSITIVI (%)</b>	66,67	83,33	50,00	62,50	58,33	41,67
<b>DUBBIO (%)</b>	8,33	4,17	4,17	0,00	0,00	0,00
<b>NEGATIVI (%)</b>	25,00	12,50	45,83	37,50	41,67	58,33



**✂ Questionari di valutazione**

A ciascun laboratorio sono stati somministrati dei questionari , uno per ciascun kit ELISA, con le seguenti domande:

DOMANDA		da	1	2	3	4	5	a
1	Come giudichi la chiarezza del protocollo fornito con il kit?	insufficiente						ottima
2	Come giudichi le lingue utilizzate nella redazione del protocollo?	incomprensibile						comprensibile
3	Come giudichi l'esecuzione del test?	facile						difficile
4	Si ritiene necessario un addestramento specifico all'esecuzione della prova?	NO		/	/	/	/	SI
5	Come consideri il volume del campione e dei reagenti a fini dell'accuratezza del prova?	scarso			<input type="checkbox"/> adeguato			eccessivo
6	Come consideri il tempo totale di esecuzione del test ?	eccessivo						breve
7	Il kit richiede l'utilizzo di strumentazioni di cui non siete in possesso?	NO		/	/	/	/	SI
8	Se si è risposto sì alla domanda 7, indicare quale strumentazione/accessorio richiesta non è in vostro possesso							
9	Come giudichi la modalità di interpretazione dei risultati?	complessa						semplice
10	Come consideri la categorizzazione dell'esito?	inadeguata						adeguata
11	Consideri il kit completo rispetto ai componenti forniti?	NO		/	/	/	/	SI
12	Se si è risposto alla domanda 11 in modo diverso da completo indicare cosa sarebbe necessario fornire							
13	Come giudichi la tenuta dei contenitori per i reagenti?	insufficiente						ottima
14	Sono presenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati?	NO		/	/	/	/	SI
15	Se si è risposto SI alla domanda 14, giudichi le informazioni fornite esaurienti?	NO		/	/	/	/	SI
16	Se si è risposto SI alla domanda 14, come giudichi le classi di rischio dei reagenti utilizzati?	pericolose						poco pericolose
17	Che valore attribuisce alla validazione del kit?	trascurabile		/	/	/	/	necessaria

Oltre alle domande vi era anche un campo Osservazioni in cui i compilatori potevano scrivere osservazioni libere.

Una volta raccolti, le risposte i questionari sono stati trascritti in un foglio Excel e per ogni quesito è stata calcolata la moda dei valori delle risposte.

In tabella 16 sono riportate le mode per ciascuna domanda per ciascun kit, ed il punteggio totale calcolato sommando le mode. Per le domande 3 e 4, il cui punteggio minore indicava una valutazione ottima, e per la domanda 5 in cui il valore ottimale era il punteggio 3, sono stati effettuate le dovute correzioni.

In Appendice III sono riportate tutte le risposte fornite eccetto quelle aperte, riportate qui di seguito.

Tabella 16 : Moda delle risposte ai questionari di valutazione e punteggio totale

DOMANDA	CTB	DPAEE	IDEXX	IDVET	SYNBIOTICS	VMRD
1	4	5	5	5	3	5
2	5	5	4	4	4	4
3	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1
5	3	1	3	3	3	3
6	2	3	5	4	5	5
7	1	1	1	1	1	1
9	5	5	5	5	5	5
10	5	5	4	5	5	5
11	1	5	5	5	5	5
13	4	5	5	5	5	5
14	5	1	1	5	1	1
15	5	5		5	5	5
16	2	5		3	5	5
17	5	5	5	5	5	5
<b>PUNTEGGIO TOTALE</b>	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>59</b>	<b>63</b>	<b>58</b>	<b>60</b>

Alla domanda aperta 8 **“Indicare quale strumentazione/accessorio richiesta non è in vostro possesso”** le risposte sono state:

CTB

- Reagenti chimici e piastre a fondo a U

SYNBIOTICS

- Filtro 630 nm

Alla domanda aperta 12 **“Indicare cosa sarebbe necessario fornire”** le risposte sono state:

CTB

- Piastre microtiter – substrato cromogeno – siero topo - soluzioni (diluenti e lavaggio)
- Reagenti chimici e piastre già assorbite
- Tamponi e la soluzione di arresto
- Piastre già adsorbite, reagenti pronti per l'uso
- Sarebbe necessario fornire i reagenti e le soluzioni necessarie per l'esecuzione della prova
- Piastra, coniugato e soluzione di arresto, tamponi.

- Mancano tutti i componenti delle diverse soluzioni che vanno preparate a parte (es. Siero di topo, lievito, tween 20, OPD...) e le piastre maxisorp.

### ERADIKIT

- Telaio in plastica per strip

Alla voce osservazioni sono state inseriti i seguenti suggerimenti

### CTB

- Migliorare i contenitori per i reagenti
- Trattandosi di un kit (in-house) che prevede la preparazione di diverse soluzioni e l'adsorbimento delle piastre, risulta di minore stabilità e più complessa esecuzione per alcuni laboratori rispetto ad un kit commerciale.
- La fase di adsorbimento delle piastre, richiedendo una incubazione di 18-24 ore, comporta una maggiore programmazione nell'esecuzione delle analisi, aumentando i tempi di risposta.
- Pur essendo riportata la classe di rischio per alcuni reagenti, tale informazione non è esauriente. In particolare non viene chiaramente indicata né la classe di rischio né pericolosità dell'acido solforico concentrato e della "soluzione di arresto" da esso composta.

### ERADIKIT

- Migliorare tenuta contenitori dei reagenti

### IDEXX

- Le strips che costituiscono la piastra sono a 12 pozzetti, anziché ad 8 pozzetti, fattore che può influire sulle modalità di lavoro abituali (disposizione controlli) e sul consumo del kit in caso di numero esiguo di campioni.
- Il protocollo del kit indica di effettuare la misurazione dei valori di assorbanza alla lunghezza d'onda di 650 nm. Non avendo il filtro specifico la lettura è stata effettuata a 620 nm.
- Pur non essendo riportata la classe di rischio dei reagenti, sono state fornite alcune informazioni in merito alla loro pericolosità.
- Nel kit è indicato l'utilizzo solo per il siero di cavallo.

### VMRD

- Oltre a non essere presenti le classi di rischio, non è stata fornita alcuna informazione in merito alla pericolosità dei reagenti.

# **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

**DISCUSSIONE****✂ Accuratezza****Sensibilità e specificità**

Tutti i kit hanno riconosciuto correttamente i sieri negativi; possiamo quindi affermare che tutti i kit hanno una specificità del 100% .

Per quanto riguarda la sensibilità tutti i kit hanno mostrato un valore superiore a 98%, e due hanno mostrato il 100% di sensibilità.

Dobbiamo ribadire che per una valutazione della specificità e sensibilità diagnostica il numero di sieri negativi e positivi da testare dovrebbe essere molto più elevato e con provenienza rappresentativa della popolazione in esame; questo pannello è stato allestito per una valutazione della sensibilità diagnostica relativa tra i diversi kit. L'interpretazione dei valori esposti quindi dovrebbe tenere conto di questa valutazione limitata e dovrebbe essere effettuata congiuntamente alla valutazione della precocità di ciascun kit.

**K di Cohen**

L'analisi della tabella 6 mostra come quasi la totalità dei kit abbia mostrato una concordanza pari ad 1 rispetto al risultato atteso in ogni laboratorio. I risultati minori di 1 possono essere così commentati:

- il valore minimo, diverso da uno, è 0,67 ed il massimo 0,95. Entrambi i valori, se interpretati secondo lo schema di valutazione proposto, devono essere considerati indice di accordo sostanziale o quasi perfetto.

- i risultati diversi d 1 sono clusterizzati in 3 laboratori e riguardano kit diversi. I sieri che hanno diminuito il valori di K dei kit CTB, IDEXX E ERADIKIT sono il 19 e il 28 (WP), mentre per il kit IDVET i sieri 8 e 9, un WP ed un MP rispettivamente. Per il kit Synbiotics invece i sieri sono il 24 e il 27 (SP), il 30 e il 7 (MP), il 12 e il 25 (WP); da notare che i sieri non sono stati correttamente identificati da parte di un solo laboratorio.

Il valore di K è influenzato anche dalla ripetibilità e dalla riproducibilità inerenti all'operatore. Essendo i risultati per gli altri laboratori concordi rispetto ai sieri che hanno ridotto il valore di concordanza per i singoli laboratori, è ipotizzabile un problema dovuto all'esecuzione e non al kit utilizzato.

**K multiplo**

La concordanza tra tutti i laboratori rispetto all'atteso è risultata essere di grado "Quasi perfetto" per tutti i kit. Le differenze tra uno e l'altro, in termini di centesimi, non sono assolutamente rilevanti.

**✂ Ripetibilità e riproducibilità****Coefficiente di variazione**

L'interpretazione del CV come indice di ripetibilità e riproducibilità, è di facile intuitività. Una fonte [13] definisce un CV come accettabile se inferiore al 20%, solo per dati di densità ottica grezzi e riportando solo un parere personale senza fornire dati o bibliografie di supporto. Un'altra fonte [14] delinea come valore soglia di CV 50%, oltre al quale non si può più considerare la distribuzione dei dati descrivibile attraverso la media e indici di dispersione derivati. Una terza fonte [15] riporta una scala di valutazione del CV con tre categorie: good ( $CV \leq 15\%$ ), fair ( $15\% > CV \leq 30\%$ ), e use with caution ( $CV > 30\%$ ). I sieri negativi in generale hanno mostrato un CV molto alto. Questo è spiegabile considerando che sia la PI che la S/P e la reattività dei sieri negativi tendono allo zero e quindi una minima variazione influenza notevolmente il CV. Da notare anche che alcuni risultati in termini di PI o S/P sono di segno negativo, contribuendo quindi ad aumentare l'ampiezza del CV.

Considerando tutto quanto suddetto e che i sieri negativi sono stati classificati correttamente, per la nostra valutazione si è tenuto conto solo dei CV dei sieri positivi. Abbiamo deciso di adottare la classificazione con tre categorie [15] ed è stato ritenuto accettabile un CV pari o inferiore al 30%. Nel caso dei sieri positivi il CV è molto ristretto per alcuni kit (CTB ed IDEXX) e più ampio per altri, ma senza comunque superare mai il 40%. In particolare due kit, VMRD e SYNBIOTICS, hanno mostrato un CV maggiore del 30% per quasi tutti i sieri.

**Accordanza**

Considerando l'accordanza come ripetibilità qualitativa possiamo affermare che tutti i kit sono ripetibili. In particolare VMRD ha mostrato una ripetibilità pari ad uno per tutti i sieri; 3 (CTB, ERADIKIT e IDEXX) hanno avuto solo un siero su 12 con minore ripetibilità; 1 (IDVET) 2 sieri e 1 (SYNBIOTICS) 3 sieri.

**Concordanza secondo Langton**

La concordanza, stimata per valutare la riproducibilità, è risultata pari ad uno per la maggioranza dei sieri esaminati e con tutti i kit utilizzati. Il siero 11 ha fatto rilevare una riproducibilità del risultato diversa da 1 con 4 kit su 6 (eccetto IDVET e VMRD). Anche i sieri 4, 5, 6, 7 hanno avuto valori diversi da 1 con i kit (IDEXX, IDVET, VMRD, SYNBIOTICS), anche se è da sottolineare che i valori sono pari a 0,9 in 4 casi su 5 e a 0,8 nel restante caso.

Il valore più basso si è riscontrato con il siero 11 ed il kit ERADIKIT: 0,48. In particolare questo siero ha dato risultati diversi dall'atteso in 3 laboratori: al lab 5 e al lab 7 le due repliche hanno dato esito dubbio/negativo, mentre al lab 9 dubbio in entrambe. Visto che anche con altri kit sono stati riscontrati problemi si potrebbe interpretare come un difetto di stabilità intrinseca del siero. Un'altra ipotesi per spiegare la performance ridotta del kit ERADIKIT potrebbe essere la ridotta quantità di siero richiesto per l'esecuzione, che potrebbe portare a risultati falsi negativi in caso di basse reattività; ma vedremo più avanti come altri dati confutino questa ipotesi.

**COR (Concordance odds ratio)**

L'analisi del COR ci permette di concludere, come dall'analisi di accordanza e concordanza, che per alcuni kit vi possa essere una variabilità interlaboratorio maggiore di quella intralaboratorio. In ogni caso questa variabilità è di grado lieve in quanto il di scostamento dal valore ideale di 1 è sempre inferiore all'unità.

**K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto**

Il K secondo Quatto misura il grado di concordanza tra i kit in diversi laboratori, indipendentemente dal risultato atteso. Questo da un indice della riproducibilità del risultato. I kit hanno mostrato un K tra 0,88 e 1, valori interpretabili come un alto grado di riproducibilità.

**✂ Valutazione sieri di animali sperimentalmente infetti**

Riconoscere il più precocemente possibile un animale come infetto è una caratteristica fondamentale per un kit ELISA che si ha intenzione di utilizzare nell'ambito di un piano di sorveglianza. Il kit ERADIKIT ha riconosciuto come positivi il 37,5 % dei 24 sieri analizzati a 21 d.p.i.; i kit CTB e IDVET il 4,17% e gli altri non hanno rilevato positivi. A 28 d.p.i. il kit ERADIKIT ha riconosciuto come positivi l' 83,3

---

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

% dei sieri, il kit CTB il 66,67; il kit IDEXX il 62,5; il kit SYNBIOTICS il 58,33 % il kit IDVET il 50% e il kit VMRD il 41,67%. L'analisi statistica ha rilevato differenze significative per il confronto tra le proporzioni a T21 ma non a T28 ( $p < 0.0001$  e  $p > 0.05$  rispettivamente). Il kit CTB, il kit ERADIKIT e il kit IDVET inoltre, hanno rilevato dei campioni dubbi a T28 in percentuale dell' 8.33 %, 4,17% e del 4,17% rispettivamente. Su questi campioni, se fossero campioni di screening, sarebbero svolte le stesse prove di conferma dei campioni positivi, aumentando quindi la sensibilità del sistema rispetto ai kit che hanno solo due categorie di risultato. Il kit ERADIKIT, probabilmente per le caratteristiche dell'antigene impiegato, presenta una precocità elevata.

### **✂ Questionari di valutazione**

I questionari di valutazione sono un metodo per rilevare valutazioni su aspetti che non possono essere valutati quantitativamente, essendo spesso di carattere soggettivo e mutevole in funzione dell'utilizzatore del kit. L'utilizzo della moda, invece della media, permette di evidenziare le valutazioni che ricorrono più frequentemente, senza risentire del peso di singole valutazioni che si collocano agli estremi della scala. In generale le somme delle mode, con le dovute correzioni, sono comprese in un range tra 56 e 63, da ritenere buono. Il punteggio massimo ottenibile è 65.

Nel particolare ci sono dei punti critici che sono emersi:

- Kit CTB: il tempo di esecuzione è ritenuto leggermente più ampio di quello ideale; il kit inoltre non è ritenuto completo e si consiglia di fornire tutti i reagenti e le soluzioni che sono richieste dalla prova se non già le piastre presensibilizzate; le classi di rischio dei reagenti sono considerate moderatamente pericolose; probabilmente per l'utilizzo dell' OPD.
- Kit ERADIKIT: il volume di siero necessario per l'esecuzione della prova è considerato eccessivamente ridotto; sono assenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati.
- Kit IDEXX, IDVET, SYNBIOTICS: sono assenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati.

- Kit SYNBIOTICS: il protocollo non è chiaro; sono assenti informazioni sulle classi di rischio dei reagenti utilizzati.

Il kit CTB è un kit in-house e sicuramente ha dei margini di miglioramento sia per quanto riguarda i tempi di esecuzione che i reagenti utilizzati. Fornire già piastre e reagenti sarebbe un traguardo auspicabile ma necessita di tempo per l'ottimizzazione e la nuova validazione che si renderebbe necessaria ogni volta si cambi qualcosa nella procedura. Da sottolineare, al fronte dei punti da migliorare suddetti, gli indubbi vantaggi in termini di precocità e di costo, decisamente minore e il fatto che sia stato validato secondo il metodo OIE [16].

Il kit ERADIKIT ha delle ottime performance e la quantità ridotta di siero non sembra influire negativamente. La quantità ridotta di siero può essere percepita, come è effettivamente accaduto nei questionari da parte di alcuni laboratori, come una possibile causa di aumento di variabilità delle misure e quindi di ridotta sensibilità. Nonostante questa percezione il kit dimostra una precocità elevata.

Tutti i kit dovrebbero fornire informazioni più dettagliate e conformi alla Nuova classificazione delle sostanze secondo il Regolamento CE 1272/2008, questo per permettere una migliore gestione dei reagenti stessi in termini di manipolazione e smaltimento.

Il kit SYNBIOTICS dovrebbe invece revisionare e rendere più chiaro il protocollo di esecuzione in particolare la parte riguardante il lavaggio.

### **CONCLUSIONI**

Questo report ha di fornire parametri di valutazione oggettivi, quali strumenti di scelta dei kit per la diagnosi sierologica per AIE da parte dei laboratori.

I parametri di scelta, oltre alle caratteristiche tecniche al kit, possono essere vari: il costo, il tempo di esecuzione e soprattutto la sensibilità e precocità che si decide di ritenere accettabile in base anche alle caratteristiche della popolazione che si va ad esaminare. Va sottolineata che la precocità è una caratteristica importantissima soprattutto nel momento in cui il piano di sorveglianza si avvicina all'eradicazione della malattia, come accade in Italia in questi anni.

Inoltre, questo confronto ha messo in evidenza come i kit necessitano di una validazione completa, effettuata seguendo delle criteri formali come quelli del

---

## ***DISCUSSIONE E CONCLUSIONI***

manuale OIE. Ad oggi, una completa validazione secondo i criteri proposti dall'OIE è stata effettuata solo per due kit: il kit in house CTB e il kit ERADIKIT.

Sarebbe auspicabile che anche le ditte produttrici rendessero completamente accessibili le metodologie seguite per la validazione e i risultati ottenuti, in modo da permettere una valutazione individuale da parte degli acquirenti.

# ***BIBLIOGRAFIA***

- 1) Ordinanza 14 novembre (2006). Disposizioni urgenti in materia di sorveglianza dell'anemia infettiva degli equidi Supplemento ordinario alla G.U. Serie generale - n. 285 7-12-2006
- 2) Ordinanza 18 dicembre 2007 Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi. G.U. n.14 del 17-01-2008
- 3) Ordinanza 8 agosto 2010 Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi. G.U. Serie Generale n. 219 del 18 settembre 2010
- 4) Coggins L., Norcross N.L. & Kemen M.J. (1973). The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. *Equine Infect. Dis.*, III, 177–186.
- 5) Coggins L., Norcross N.L. & Nusbaum S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, 33, 11–18.
- 6) Issel CJ et al. 1993 A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia *J Vet Diagn investigation* ;5 ; pp137-141
- 7) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012* Chapter 1.1.5.
- 8) D. Langton et al. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance", *International Journal of Food Microbiology* 79 (2002) 175-181
- 9) Lamberto Soliani con la collaborazione di Franco Sartore e Enzo Siri "Manuale di statistica per la ricerca e la professione statistica univariata e bivariata parametrica e non-parametrica per le discipline ambientali e biologiche" edizione aprile 2005 <http://www.dsa.unipr.it/soliani/soliani.html>
- 10) J. Richard Landis e Gary G. Koch del 1977 "The measurement of observer agreement for categorical data" *Biometrics*, Vol. 33, pp.159-174.
- 11) P. Quatto (2004). "Un test di concordanza tra più esaminatori". In: *Statistica*, vol. 64, n. 1, pp. 145-151.
- 12) P. Quatto (2004). "Un test sulla natura casuale dell'accordo tra più esaminatori". In: *Statistica Applicata*, vol. 16, n. 3, pp. 375-384
- 13) R.H. Jacobson (1998) - Validation of serological assay for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 17, 2, 469-486.
- 14) <http://www.galenotech.org/medie2.htm>
- 15) [http://www.ofm.wa.gov/pop/acs/userguide/ofm\\_acs\\_user\\_guide.pdf](http://www.ofm.wa.gov/pop/acs/userguide/ofm_acs_user_guide.pdf)

- 16) G.L. Autorino , R. Nardini , I. Ciabatti, R. Lorenzetti, P. Cordioli , D. Caciolo , E. Letizia, M.T. Scicluna "Validazione di un elisa competitiva per la ricerca di anticorpi contro la p26 del virus dell'anemia infettiva equina nel siero di equidi" Quarto Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, Brescia 9-10/06/2011

# ***APPENDICI***

## APPENDICE I

Valori di sensibilità (Se) e specificità (Sp) ottenuti da ciascun laboratorio per ciascun kit

	LAB 1		LAB 2		LAB 3		LAB 4		LAB 5	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
<b>CTB</b>	100	100	100	100	100	100	-	-	<b>95,45</b>	100
<b>ERADIKIT</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	<b>95,45</b>	100
<b>IDEXX</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>IDVET</b>	<b>90,9</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>VMRD</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>SYNBIOTICS</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	LAB 6		LAB 7		LAB 8		LAB 9		LAB 10	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
<b>CTB</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>ERADIKIT</b>	100	100	<b>95,45</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b>IDEXX</b>	100	100	<b>81,83</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b>IDVET</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>VMRD</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>SYNBIOTICS</b>	100	100	<b>86,36</b>	100	100	100	100	100	100	100

APPENDICE II

Valori di Coefficiente di Variazione (CV) per ciascun kit e per ciascun laboratorio

	CTB									
SIERI	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	TOTALE
1	0,09	0,11	0,16	1,19	0,10	0,71	0,25	1,33	0,00	<b>1,44</b>
2	0,63	0,25	0,41	2,78	0,03	0,32	0,33	0,26	0,06	<b>0,98</b>
3	0,83	0,03	0,08	0,44	0,17	0,36	0,10	0,16	0,06	<b>1,39</b>
4	2,16	0,14	0,20	0,26	0,03	0,57	0,27	0,13	0,09	<b>1,65</b>
5	0,14	0,11	0,12	2,09	0,20	0,86	0,10	0,45	0,03	<b>0,82</b>
6	1,03	0,08	0,78	0,97	0,13	0,43	0,30	0,20	0,03	<b>1,87</b>
7	0,17	0,11	0,00	0,18	0,20	0,53	0,27	0,03	0,06	<b>1,54</b>
8	0,46	0,14	0,61	3,56	0,00	0,36	0,07	0,45	0,03	<b>1,16</b>
9	0,26	0,14	0,12	1,08	0,17	0,36	0,40	0,29	0,21	<b>1,46</b>
10	0,17	0,03	0,00	0,52	0,07	0,07	0,27	0,16	0,09	<b>1,28</b>
11	4,55	0,09	0,20	19,88	3,37	0,49	2,76	0,31	0,19	<b>18,74</b>
12	107,76	30,02	636,11	60,93	129,42	31,21	48,25	54,99	35,48	<b>108,96</b>

	ERADIKIT										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	TOTALE
1	0,89	0,98	0,00	1,69	1,26	3,10	1,66	1,63	1,75	1,20	<b>23,73</b>
2	5,63	1,50	2,43	3,09	0,57	2,61	4,49	16,94	0,82	9,39	<b>24,25</b>
3	2,39	10,33	0,61	7,30	5,86	1,42	3,10	1,89	1,49	3,19	<b>19,42</b>
4	3,63	0,94	5,18	2,07	12,83	1,22	2,83	5,81	1,64	0,00	<b>22,19</b>
5	1,40	3,42	5,91	3,95	9,51	2,80	0,00	8,04	0,15	2,51	<b>21,67</b>
6	4,85	41,80	5,95	6,19	8,66	1,25	7,19	1,22	2,39	1,44	<b>21,02</b>
7	18,12	8,25	0,00	1,52	12,96	6,11	3,88	7,40	2,28	9,39	<b>23,64</b>
8	1,04	1,71	0,42	5,51	12,78	2,94	4,01	2,73	6,53	13,64	<b>24,94</b>
9	0,05	0,00	1,32	5,16	38,64	5,03	1,87	2,91	0,94	52,95	<b>27,18</b>
10	43,92	0,78	9,53	3,88	19,84	14,32	3,15	7,22	0,88	5,14	<b>26,52</b>
11	2,66	12,05	5,37	10,20	23,09	3,51	9,21	17,69	0,26	6,31	<b>29,20</b>
12	26,04	15,66	11,72	30,49	103,12	30,52	68,71	24,47	21,66	74,40	<b>55,27</b>

	IDEXX										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	TOTALE
1	0,29	0,53	0,12	0,25	0,25	0,27	1,01	0,92	2,37	0,00	<b>3,65</b>
2	0,37	1,73	0,47	0,42	0,50	0,09	0,75	0,26	1,10	4,13	<b>3,74</b>
3	0,95	1,62	2,53	0,42	0,91	0,36	0,56	0,53	1,99	9,29	<b>5,29</b>
4	0,66	0,93	0,24	0,25	1,17	1,16	0,28	0,79	3,64	6,12	<b>4,62</b>
5	0,96	0,13	9,46	0,25	0,08	0,45	0,47	1,06	2,92	5,47	<b>5,18</b>
6	5,57	1,55	3,50	1,28	1,57	2,12	2,24	1,47	1,70	6,51	<b>9,59</b>
7	0,15	0,13	0,60	0,17	0,92	1,35	0,19	0,27	1,55	5,75	<b>4,75</b>
8	0,22	0,27	0,98	0,84	0,76	0,18	0,29	0,00	2,00	1,51	<b>4,35</b>
9	0,22	0,53	3,05	0,67	2,26	0,36	0,28	0,27	1,08	0,60	<b>4,19</b>
10	0,74	0,68	3,67	0,17	0,34	0,27	0,37	0,13	3,27	0,44	<b>3,81</b>
11	2,61	0,16	2,07	0,18	1,46	0,21	0,66	2,47	3,24	3,52	<b>6,76</b>
12	92,53	-510,30	-41,13	98,53	-46,51	-849,08	-31,12	103,89	-78,57	-127,54	<b>-312,69</b>

## APPENDICI

	IDVET									
	LAB 1	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	TOTALE
1	0,81	2,46	2,17	2,83	28,85	17,11	2,43	0,36	1,87	21,31
2	2,82	1,70	4,83	1,07	0,00	0,91	0,04	0,36	0,00	17,44
3	2,86	7,05	0,24	0,74	0,00	3,47	2,35	0,49	3,54	17,97
4	1,35	7,94	3,77	6,03	0,00	3,46	2,15	0,19	0,99	17,19
5	138,67	11,58	0,11	0,33	0,00	0,96	1,68	0,36	2,06	30,70
6	138,26	0,78	2,38	2,00	1,16	0,79	1,53	0,13	2,06	30,74
7	1,12	9,72	7,42	6,94	0,00	6,95	2,80	0,16	0,00	18,34
8	0,51	3,83	6,12	3,83	0,00	3,32	0,52	0,16	0,00	18,06
9	5,45	3,78	2,30	0,05	0,00	6,41	0,63	0,36	1,07	18,36
10	7,16	3,71	2,10	11,10	0,00	4,58	0,48	0,29	1,30	18,40
11	3,60	10,31	6,29	5,80	0,24	1,04	1,67	0,20	0,78	15,15
12	108,33	-57,53	-150,17	213,57	104,76	446,46	-791,90	52,31	109,63	534,31

	VMRD										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	TOTALE
1	4,00	5,19	0,73	1,19	3,66	2,10	11,51	0,28	0,41	2,48	34,86
2	0,59	1,56	1,49	3,40	2,15	3,12	2,19	2,04	1,38	0,19	34,56
3	4,29	1,15	5,59	0,23	2,01	1,67	5,35	2,77	2,83	4,66	34,75
4	13,67	2,08	0,45	8,93	3,15	1,29	2,66	5,61	2,92	18,39	35,87
5	5,17	9,86	2,98	6,48	5,22	4,74	3,05	0,10	9,39	0,21	34,34
6	5,44	1,78	6,80	4,48	0,89	0,80	0,16	0,78	10,19	11,70	36,10
7	0,92	2,17	3,54	1,20	1,78	0,94	0,09	3,97	1,48	0,00	34,04
8	3,97	2,92	2,35	13,19	3,61	1,37	0,36	11,31	0,66	6,40	34,99
9	0,97	3,04	1,36	5,18	8,53	4,86	36,88	3,74	8,36	11,89	36,02
10	3,62	5,87	1,43	4,72	0,05	5,66	1,35	2,83	4,10	3,21	33,71
11	4,46	3,53	9,48	20,81	4,16	5,68	7,03	0,51	2,69	0,00	34,50
12	15,99	11,48	7,51	12,97	6,56	7,31	11,52	8,62	13,42	10,64	35,28

	SYNBIOTICS										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	TOTALE
1	5,76	6,21	0,97	0,77	5,89	6,24	14,13	2,32	2,41	9,53	33,91
2	6,73	23,21	7,24	8,27	2,32	5,81	21,57	0,24	4,48	23,88	38,14
3	4,74	2,26	12,07	6,32	0,00	5,79	5,26	2,83	2,92	5,28	38,17
4	20,11	7,70	1,65	10,18	3,74	2,90	1,70	9,03	0,94	7,67	36,16
5	9,62	6,83	1,17	0,00	8,23	4,87	2,43	0,47	12,00	20,20	34,55
6	11,06	4,61	7,70	3,35	4,96	1,51	0,90	11,81	18,06	7,78	36,87
7	11,03	2,73	2,53	4,76	2,95	0,85	8,09	3,56	2,04	22,19	40,00
8	14,87	5,98	26,10	10,19	5,53	0,76	2,12	6,37	21,22	24,20	33,86
9	8,40	2,31	4,00	10,88	7,77	0,89	2,41	7,09	0,89	1,25	37,42
10	12,73	1,95	13,46	0,48	46,47	3,26	13,46	9,09	0,48	13,36	34,74
11	6,35	8,60	16,52	4,97	23,41	11,18	16,45	11,74	16,75	12,39	38,45
12	9,30	74,43	7,54	6,43	10,80	5,86	9,62	15,42	7,45	15,59	52,30

APPENDICE III

Valori di Accordanza per ciascun kit e per ciascun laboratorio

	CTB									
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
11	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

	ERADIKIT									
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
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	1	1	1	1	1	1	1	1	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	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	IDEXX									
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
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	1	1	1	1	1	1	1	1	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	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

IDVET										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
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	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	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	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

VMRD										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
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	1	1	1	1	1	1	1	1	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	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

SYNBIOTICS										
	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	0	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	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## APPENDICE IV

Valori di Concordanza per ciascun kit e per ciascun laboratorio

Siero	CTB	ERADIKIT	IDEXX	IDVET	VMRD	SYNBIOTICS
1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	<b>0,90</b>
5	1,00	1,00	1,00	<b>0,90</b>	1,00	1,00
6	1,00	1,00	<b>0,80</b>	<b>0,90</b>	1,00	1,00
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	<b>0,90</b>
8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11	<b>0,78</b>	<b>0,48</b>	<b>0,80</b>	1,00	1,00	<b>0,80</b>
12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

## APPENDICE V

Risultati delle prove su sieri di muli sperimentalmente infetti a T21 e a T28 dpi (+vo= positivo;-vo= negativo)

T21						
SIERI	CTB	ERADIKIT	IDVET	IDEXX	SYMBIOTICS	VMRD
1	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
2	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
3	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
4	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
5	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
6	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
7	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
8	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
9	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
10	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
11	+vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
12	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
13	-vo	+vo	+vo	-vo	-vo	-vo
14	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
15	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
16	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
17	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
18	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
19	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
20	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
21	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
22	-vo	+vo	-vo	-vo	-vo	-vo
23	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo
24	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo	-vo

T28						
SIERI	CTB	ERADIKIT	IDVET	IDEXX	SYMBIOTICS	VMRD
1	-VO	+VO	-VO	-VO	-VO	-VO
2	-VO	-VO	-VO	-VO	-VO	-VO
3	+VO	+VO	-VO	+VO	+VO	-VO
4	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
5	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
6	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
7	-VO	+VO	+VO	-VO	-VO	-VO
8	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
9	+VO	+VO	-VO	+VO	+VO	-VO
10	+VO	+VO	-VO	+VO	-VO	-VO
11	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
12	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
13	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	-VO
14	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
15	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
16	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
17	Dubbio	+VO	-VO	-VO	+VO	-VO
18	+VO	+VO	-VO	-VO	-VO	-VO
19	-VO	-VO	-VO	-VO	-VO	-VO
20	-VO	+VO	-VO	-VO	-VO	-VO
21	-VO	-VO	-VO	-VO	-VO	-VO
22	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO	+VO
23	+VO	+VO	Dubbio	+VO	-VO	-VO
24	Dubbio	Dubbio	-VO	-VO	-VO	-VO

APPENDICE VI

Risposte fornite dai laboratori ai questionari di valutazione

<b>CTB</b>									
<b>DOMANDA</b>	<b>LAB 2</b>	<b>LAB 3</b>	<b>LAB 4</b>	<b>LAB 5</b>	<b>LAB 6</b>	<b>LAB 7</b>	<b>LAB 8</b>	<b>LAB 9</b>	<b>LAB 10</b>
1	1	4	4	4	4	5	5	4	5
2	5	5	5	5	4	5	5	5	5
3	5	1	3	2	4	1	5	1	2
4	5	1	5	1	1	1	5	1	1
5	1	3	3	3	5	3	3	3	3
6	1	4	2	3	2	3	2	1	2
7	1	1	5	1	1	1	1	1	1
8									
9	5	5	5	5	5	5	4	5	5
10	5	4	5	5	5	5	5	5	5
11	1	5	1	1	1	5	1	1	1
12									
13	2	4	4	5	4	3	5	3	3
14	1	1	1	5	5	1	5	5	5
15				5	5		1	5	5
16				3	4		2	2	3
17	5	1	5	5	5	NR	5	5	5

<b>ERADIKIT</b>									
<b>DOMANDA</b>	<b>LAB 2</b>	<b>LAB 3</b>	<b>LAB 4</b>	<b>LAB 5</b>	<b>LAB 6</b>	<b>LAB 7</b>	<b>LAB 8</b>	<b>LAB 9</b>	<b>LAB 10</b>
1	5	4	5	5	5	5	5	5	5
2	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3	2	3	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	5	1	1	1	1	1	1
5	1	1	3	1	1	1	1	3	3
6	1	3	3	3	5	3	3	3	2
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8									
9	5	4	5	5	5	5	5	5	4
10	5	3	5	5	5	5	5	5	5
11	5	5	5	5	1	NR	5	5	5
12									
13	5	NR	5	2	2	1	4	5	1
14	1	5	1	1	5	NR	1	1	1
15		5			5				
16		5			5				
17	5	1	5	5	5	5	5	5	5

IDEXX									
DOMANDA	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
1	4	4	5	5	5	5	5	3	5
2	4	2	4	4	5	5	4	3	5
3	1	1	1	1	1	5	1	1	1
4	1	1	5	1	1	1	1	1	1
5	5	3	3	3	1	3	5	3	3
6	4	5	5	5	5	5	5	4	5
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8									
9	5	5	5	5	5	5	5	3	5
10	5	4	4	3	5	5	3	2	4
11	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12									
13	5	4	5	5	5	5	5	4	5
14	1	1	1	1	5	5	1	1	1
15						5			
16						5			
17	5	1	5	5	5	5	5	NR	5

IDVET									
DOMANDA	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
1	5	4	5	5	5	5	5	4	5
2	4	2	4	4	5	5	4	3	5
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	5	1	1	1	1	1	1
5	3	3	3	3	5	3	3	3	3
6	3	4	4	5	5	3	4	4	3
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8									
9	4	4	5	5	5	5	5	5	5
10	4	3	5	5	5	5	5	5	5
11	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12									
13	5	4	5	5	5	5	5	4	5
14	5	5	1	5	5	5	5	5	1
15		5		1	5	5	1	5	1
16	2	5		3	5	5	3	3	3
17	5	NR	5	5	5	5	5	5	5

SYNBIOTICS									
DOMANDA	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
1	5	3	4	4	5	5	3	3	4
2	4	2	4	4	4	5	4	3	5
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	5	1	1	1	1	1	1
5	3	1	3	3	3	3	3	3	3
6	5	5	5	5	5	5	5	5	5
7	1	1	1	1	1	1	1	5	1
8									
9	5	5	5	5	5	5	3	3	5
10	5	4	3	3	5	2	2	1	1
11	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12									
13	5	4	5	5	5	5	5	NR	5
14	1	1	1	1	5	5	1	1	1
15					5	5			
16					5	5			
17	5	5	5	5	5	5	5	NR	5

VMRD									
DOMANDA	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	LAB 10
1	3	4	5	4	5	5	5	4	5
2	4	2	4	4	5	5	4	3	5
3	2	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	5	1	1	1	1	1	1
5	3	3	3	3	5	3	3	3	3
6	4	5	5	5	5	3	5	4	5
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8									
9	5	3	5	5	5	5	5	5	5
10	5	4	4	3	5	5	1	3	1
11	5	5	5	5	5	5	5	1	5
12									
13	5	4	NR	5	5	5	5	4	5
14	1	1	1	5	5	5	1	1	1
15				1	5	5			
16				3	5	5			
17	5	5	5	5	5	5	5	5	5