



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DEL LAZIO E DELLA TOSCANA - M. ALEANDRI**

Direzione Operativa Diagnosi Malattie Virali e delle Leptospirosi

Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini (CERME)

Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE)



REPORT

CIRCUITO INTERLABORATORIO

per AIE

TECNICA AGID Anno 2014

ENTE ORGANIZZATORE: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA
Centro Referenza Nazionale Anemia Infettiva Equina
Responsabile: Dott.ssa Maria Teresa Scicluna
E-mail: teresa.scicluna@izslt.it
Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma
Tel. +39 06 79099353 Fax: +39 06 79340724
E-mail: centroreferenzaaie@izslt.it

GRUPPO DI LAVORO:

Raffaele Frontoso
Roberto Nardini
Ida Ricci
Francesca Rosone
Maria Teresa Scicluna

Alessia Altigeri
Roberta Giordani
Silvia Gregnanini
Silvia Polenta
Samanta Sabatini
Massimiliano Simula
Donatella Stilli
Maria Rita Viola

Tabella di decodifica dei campioni inviati. In ordine discendente il n° siero originale (confronta Tabella 1), il risultato qualitativo atteso (0=negativo; 1= positivo; 2= non conclusivo), lo score atteso (NI= non inserito) e il numero aliquota di ciascun pannello.

N° SIERO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
RIS. ATTESO	0	0	0	2	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	1	0	0	1	0
SCORE ATTESO	0	0	0	1/NI	0	0	3	1	4	0	4	0	0	1	1	4	2	1	2	0	2	4	1	1	1/NI	3	0	0	2	0
LAB. 1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30
LAB. 3	B30	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29
LAB. 4	C29	C30	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28
LAB. 5	D28	D29	D30	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27
LAB. 10	E27	E28	E29	E30	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E25	E26
LAB. 11	F26	F27	F28	F29	F30	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25
LAB. 12	G25	G26	G27	G28	G29	G30	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	G24
LAB. 14	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23
LAB. 15	I23	I24	I25	I26	I27	I28	I29	I30	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20	I21	I22
LAB. 16	J22	J23	J24	J25	J26	J27	J28	J29	J30	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	J21
LAB. 17	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
LAB. 18A	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19
LAB. 19	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18
LAB. 20	O18	O19	O20	O21	O22	O23	O24	O25	O26	O27	O28	O29	O30	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16	O17
LAB. 22	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
LAB. 23	Q16	Q17	Q18	Q19	Q20	Q21	Q22	Q23	Q24	Q25	Q26	Q27	Q28	Q29	Q30	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15
LAB. 25	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14
LAB. 26	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
LAB. 27	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
LAB. 30	U12	U13	U14	U15	U16	U17	U18	U19	U20	U21	U22	U23	U24	U25	U26	U27	U28	U29	U30	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11
LAB. 31	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24	V25	V26	V27	V28	V29	V30	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
LAB. 33	W10	W11	W12	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19	W20	W21	W22	W23	W24	W25	W26	W27	W28	W29	W30	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
LAB. 42	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28	X29	X30	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
LAB. 44	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16	Y17	Y18	Y19	Y20	Y21	Y22	Y23	Y24	Y25	Y26	Y27	Y28	Y29	Y30	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7
LAB. 45	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	Z13	Z14	Z15	Z16	Z17	Z18	Z19	Z20	Z21	Z22	Z23	Z24	Z25	Z26	Z27	Z28	Z29	Z30	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6
LAB. 46	CP29	CP30	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18	CP19	CP20	CP21	CP22	CP23	CP24	CP25	CP26	CP27	CP28
LAB. 47	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	AB13	AB14	AB15	AB16	AB17	AB18	AB19	AB20	AB21	AB22	AB23	AB24	AB25	AB26	AB27	AB28	AB29	AB30	AB1	AB2	AB3	AB4
LAB. 48	AC4	AC5	AC6	AC7	AC8	AC9	AC10	AC11	AC12	AC13	AC14	AC15	AC16	AC17	AC18	AC19	AC20	AC21	AC22	AC23	AC24	AC25	AC26	AC27	AC28	AC29	AC30	AC1	AC2	AC3
LAB. 49	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10	AD11	AD12	AD13	AD14	AD15	AD16	AD17	AD18	AD19	AD20	AD21	AD22	AD23	AD24	AD25	AD26	AD27	AD28	AD29	AD30	AD1	AD2
LAB. 51	AE2	AE3	AE4	AE5	AE6	AE7	AE8	AE9	AE10	AE11	AE12	AE13	AE14	AE15	AE16	AE17	AE18	AE19	AE20	AE21	AE22	AE23	AE24	AE25	AE26	AE27	AE28	AE29	AE30	AE1
LAB. 52	AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6	AF7	AF8	AF9	AF10	AF11	AF12	AF13	AF14	AF15	AF16	AF17	AF18	AF19	AF20	AF21	AF22	AF23	AF24	AF25	AF26	AF27	AF28	AF29	AF30
LAB. 53	AG30	AG1	AG2	AG3	AG4	AG5	AG6	AG7	AG8	AG9	AG10	AG11	AG12	AG13	AG14	AG15	AG16	AG17	AG18	AG19	AG20	AG21	AG22	AG23	AG24	AG25	AG26	AG27	AG28	AG29
LAB. 54	AH29	AH30	AH1	AH2	AH3	AH4	AH5	AH6	AH7	AH8	AH9	AH10	AH11	AH12	AH13	AH14	AH15	AH16	AH17	AH18	AH19	AH20	AH21	AH22	AH23	AH24	AH25	AH26	AH27	AH28
LAB. 55	AJ28	AJ29	AJ30	AJ1	AJ2	AJ3	AJ4	AJ5	AJ6	AJ7	AJ8	AJ9	AJ10	AJ11	AJ12	AJ13	AJ14	AJ15	AJ16	AJ17	AJ18	AJ19	AJ20	AJ21	AJ22	AJ23	AJ24	AJ25	AJ26	AJ27
LAB. 56	AK26	AK27	AK28	AK29	AK30	AK1	AK2	AK3	AK4	AK5	AK6	AK7	AK8	AK9	AK10	AK11	AK12	AK13	AK14	AK15	AK16	AK17	AK18	AK19	AK20	AK21	AK22	AK23	AK24	AK25
LAB. 59	AL25	AL26	AL27	AL28	AL29	AL30	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6	AL7	AL8	AL9	AL10	AL11	AL12	AL13	AL14	AL15	AL16	AL17	AL18	AL19	AL20	AL21	AL22	AL23	AL24
LAB. 60	AM24	AM25	AM26	AM27	AM28	AM29	AM30	AM1	AM2	AM3	AM4	AM5	AM6	AM7	AM8	AM9	AM10	AM11	AM12	AM13	AM14	AM15	AM16	AM17	AM18	AM19	AM20	AM21	AM22	AM23
LAB. 61	AN23	AN24	AN25	AN26	AN27	AN28	AN29	AN30	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7	AN8	AN9	AN10	AN11	AN12	AN13	AN14	AN15	AN16	AN17	AN18	AN19	AN20	AN21	AN22
LAB. 62	AO22	AO23	AO24	AO25	AO26	AO27	AO28	AO29	AO30	AO1	AO2	AO3	AO4	AO5	AO6	AO7	AO8	AO9	AO10	AO11	AO12	AO13	AO14	AO15	AO16	AO17	AO18	AO19	AO20	AO21
LAB. 63	AP21	AP22	AP23	AP24	AP25	AP26	AP27	AP28	AP29	AP30	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	AP9	AP10	AP11	AP12	AP13	AP14	AP15	AP16	AP17	AP18	AP19	AP20
LAB. 64	AQ20	AQ21	AQ22	AQ23	AQ24	AQ25	AQ26	AQ27	AQ28	AQ29	AQ30	AQ1	AQ2	AQ3	AQ4	AQ5	AQ6	AQ7	AQ8	AQ9	AQ10	AQ11	AQ12	AQ13	AQ14	AQ15	AQ16	AQ17	AQ18	AQ19
LAB. 65	AR19	AR20	AR21	AR22	AR23	AR24	AR25	AR26	AR27	AR28	AR29	AR30	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6	AR7	AR8	AR9	AR10	AR11	AR12	AR13	AR14	AR15	AR16	AR17	AR18
LAB. 66	AS18	AS19	AS20	AS21	AS22	AS23	AS24	AS25	AS26	AS27	AS28	AS29	AS30	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6	AS7	AS8	AS9	AS10	AS11	AS12	AS13	AS14	AS15	AS16	AS17
LAB. 69	AT17	AT18	AT19	AT20	AT21	AT22	AT23	AT24	AT25	AT26	AT27	AT28	AT29	AT30	AT1	AT2														

INDICE

INTRODUZIONE	5
SCOPO DEL CIRCUITO	5
DESCRIZIONE DEL CIRCUITO	5
Adesione al circuito	5
Identificazione dei laboratori partecipanti	5
Riservatezza	5
Composizione, preparazione e fornitura dei campioni da esaminare	6
Composizione del pannello di campioni	6
Invio e conservazione dei campioni	8
Controllo di qualità	8
Test di omogeneità	8
Test di stabilità	8
Espressione dei risultati	8
Valutazione dei risultati	9
RISULTATI	11
Metodo D.M. 04/12/1976 (Coggins)	11
K di Cohen e K multiplo	11
Ripetibilità (accordanza)	12
Riproducibilità (concordanza)	14
Percentuali di errore	15
Metodo OIE	16
K di Cohen e K multiplo	16
Ripetibilità (accordanza)	17
Riproducibilità (concordanza)	19
Percentuali di errore	20
DISCUSSIONE	21
Metodo Coggins	21
Metodo OIE	23
CONCLUSIONI	25

AZIONI CORRETTIVE	27
APPENDICE I	28
RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI	32

INTRODUZIONE

Il Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) organizza un circuito di prove interlaboratorio (CI) che consente di verificare i livelli di competenza tecnica e diagnostica dei laboratori che effettuano diagnosi sierologica di Anemia Infettiva Equina (AIE).

Il documento ha lo scopo di rendere note le modalità di organizzazione del circuito, di preparazione dei campioni e i criteri di valutazione delle prestazioni dei laboratori partecipanti.

SCOPO DEL CIRCUITO

Scopo del circuito è di monitorare nel tempo i livelli di competenza tecnica e diagnostica dei laboratori che effettuano diagnosi sierologica di AIE mediante la tecnica AGID (metodo D.M. 04/12/1976¹ e/o metodo OIE: Manuale OIE 2013², Cap 2.5.3 pag 3-4).

DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

Adesione al circuito

La lettera di "Richiesta adesione Ring Test AIE" è inviata tramite e-mail a tutta la rete di laboratori ufficiali che effettuano la diagnosi sierologica dell'AIE.

Nella comunicazione è indicato anche il termine di iscrizione. La comunicazione richiede conferma di riceuta e di adesione con lo stesso mezzo, per attestare il passaggio dell'informazione.

Identificazione dei laboratori partecipanti

Ad ogni laboratorio è assegnato un codice numerico univoco di identificazione.

Ogni comunicazione inoltrata, sia da parte del laboratorio organizzatore sia del laboratorio partecipante, dovrà fare riferimento al codice identificativo attribuito.

Riservatezza

I dati, trattati in forma riservata, saranno utilizzati dal laboratorio organizzatore esclusivamente per l'analisi e valutazione dei risultati.

I risultati saranno messi a disposizione del Ministero della Salute e, se richiesti, ad enti terzi autorizzati, previa informazione per iscritto ai partecipanti al circuito.

Composizione, preparazione e distribuzione dei campioni da esaminare

Composizione del pannello di campioni

Il pannello di campioni da esaminare è composto da sieri positivi e negativi, preparato a partire da sieri equini di collezione disponibili presso il CRAIE.

Il pannello di 30 è composto da 15 sieri, ciascuno inviato ai laboratori in doppia aliquota per la valutazione della ripetibilità e della riproducibilità del sistema.

All'interno dei 30 sieri sono presenti 3 gruppi di risultati qualitativi:

- 12 sieri classificati come negativi, di questi, 4 sieri sono di difficile interpretazione, per i quali la moda dei risultati delle prove preliminari è risultata essere negativa con score 0 (vedi Appendice I).
- 16 sieri classificati come positivi
- 2 sieri classificati come non conclusivo (per presenza di alone)

A ciascun siero è stato assegnato un punteggio (score) secondo lo schema seguente (Figura 1) proposta dal National Veterinary Services Laboratories (USDA)³:

Figura 1: Classificazione delle reattività in AGID con il punteggio (score) da 0 a 5.



- Reazione debolmente positiva - Il siero la cui linea di precipitazione determina l'incurvamento più o meno accentuato della linea di precipitazione tra Ag e SPL come da pozzetti identificati con i numeri da 1 a 3.
- Reazione mediamente positiva – Il siero in esame quando forma una linea di identità con la linea di precipitazione tra Ag e SPL, come da pozzetto identificato con il numero 4.
- Reazione fortemente positiva – Il siero la cui linea di precipitazione si presenta interrotta a circa la metà, come da pozzetto identificato con il numero 5.

- Reazione negativa - Il siero che non forma né una linea di identità con l'Ag e né un incurvamento o interruzione della linea di precipitazione tra Ag e SPL, come da pozzetti identificati con l'abbreviazione Neg.

In Tabella 1 è riportato per ciascuno dei 15 sieri utilizzati, l'esito atteso, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (score) e il numero identificativo delle due aliquote derivanti, che costituiscono il pannello di 30 sieri. Il siero 4 poteva essere riportato come non conclusivo senza score o anche con score 1, non è stato ritenuto corretto il risultato negativo. I sieri da 12 a 15 sono composti da siero equino del commercio Gibco ®. Per la corrispondenza tra i numeri aliquota sotto riportati e quelli dei pannelli inviati si rimanda al prospetto a pagina 2.

I campioni dei pannelli inviati sono stati identificati progressivamente con un codice alfanumerico composto da una o più lettere seguite da un numero compreso tra 1 a 30.

Tabella 1: Esito atteso (qualitativo e quantitativo) e numero identificativo delle due aliquote derivanti dai 15 sieri utilizzati per la composizione del pannello (NI= Non inserito)

N° SIERO	NUMERO ALIQUOTE DERIVANTI		ESITO ATTESO	SCORE
1	16	9	POSITIVO	4
2	19	17	POSITIVO	2
3	21	29	POSITIVO	2
4	25	4	NON CONCLUSIVO	1/NI
5	14	8	POSITIVO	1
6	11	22	POSITIVO	4
7	26	7	POSITIVO	3
8	24	15	POSITIVO	1
9	18	23	POSITIVO	1
10	28	10	NEGATIVO	0
11	13	5	NEGATIVO	0
12	3	2	NEGATIVO	0
13	1	30	NEGATIVO	0
14	6	27	NEGATIVO	0
15	12	20	NEGATIVO	0

La valutazione dell' omogeneità e della stabilità dei campioni preparati è stata condotta dopo distribuzione in provetta (aliquote da 0,18 ml) e successivo scongelamento, come riportato nel paragrafo "Controllo di qualità".

Invio e conservazione dei campioni

I pannelli congelati sono stati inviati alle Sedi Centrali tramite corriere, previa comunicazione ai laboratori partecipanti.

Controllo di qualità

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 rispettivamente dopo 24 e 48 ore di incubazione.

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 rispettivamente dopo 24 e 48 ore di incubazione.

I risultati delle prove di omogeneità e stabilità sono riportate nell'Appendice I.

Espressione dei risultati

Gli esiti sono stati espressi come risultato categorico (positivo, negativo, non conclusivo) e come score di positività (0-5) e riportati nel "Modulo Risultati CI 2014 AGID", restituito entro la data di scadenza all'indirizzo e-mail: centroreferenzaaie@izslt.it.

Valutazione dei risultati

Per l'analisi statistica è stata valutata la concordanza mediante il calcolo del K di Cohen⁴ sul risultato qualitativo (positivo/negativo/ non conclusivo). Per i sieri con risultato atteso non conclusivo, sono stati ritenuti corretti sia i risultati “non conclusivo ” che “positivo”. Per valutare la concordanza del sistema dei laboratori partecipanti è stato utilizzato il K multiplo⁵.

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:

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

Dove P_o è la proporzione osservata e P_e la proporzione attesa per effetto del caso.

Il K multiplo si calcola con la stessa formula sopra riportata ma in questo caso P_o e P_e sono rappresentati dalle medie dei P_o e P_e di tutti i laboratori.

Ciascuno dei parametri suddetti è stato valutato separatamente per i due metodi.

I laboratori potranno valutare la propria attività secondo la griglia di valutazione proposta da Landis e Koch⁶, di seguito riportata (Tabella 2).

Tabella 2: Valutazione del valore di K proposta da Landis e Koch

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

Ai fini del circuito viene considerato accettabile un valore di $K \geq 0,81$.

La ripetibilità e la riproducibilità dei risultati, ovvero la variabilità intra- ed interlaboratorio rispettivamente, sono stati valutate tramite i parametri di accordanza e concordanza secondo quanto proposto da Langton⁷.

L'accordanza è l'equivalente qualitativo della ripetibilità ed è definita come la probabilità che un campione, analizzato in doppio, dia lo stesso esito, 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 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 combinazioni utilizzando la formula:

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

Dove C è il numero di combinazioni possibili, n è il numero di risultati e k è il numero di risultati che formano ogni combinazione. Nel nostro caso i sieri positivi sono stati forniti solo in due ripetizioni quindi il valore di accordanza può risultare solo 100 (i risultati delle due ripetizioni sono uguali) o 0 (i risultati delle due ripetizioni sono diverse). Per il siero negativo invece, che è stato fornito in 8 ripetizioni è stata applicata la formula riportata sopra ed il valore di accordanza può variare da 0 a 100.

La concordanza è, per i dati qualitativi, l'equivalente della riproducibilità ed è definita come la probabilità che lo stesso campione inviato a due o più 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, con il metodo sopra descritto.

É stata inoltre calcolata una concordanza totale per il sistema dei laboratori per ciascun metodo ed l'analisi descrittiva delle percentuali di errore delle diverse categorie di siero (negativo, positivo, non conclusivo).

RISULTATI

Metodo D.M. 04/12/1976 (Coggins)

K di Cohen e K multiplo

In Tabella 3 sono riportati i valori di K di Cohen per i laboratori che hanno impiegato il metodo D.M. 04/12/1976 comunemente indicato come Coggins test.

In Tabella 4 è mostrato il numero di laboratori che hanno impiegato il metodo Coggins e il valore di K multiplo.

Tabella 3: Valori di K di Cohen dei laboratori che hanno impiegato il metodo Coggins

METODO COGGINS			
N° LABORATORIO	K	N° LABORATORIO	K
1	1	31	0,88
3	1	42	0,81
14	0,88	44	0,75
18 a	0,88	45	0,75
19	0,77	46	0,75
20	0,94	47	0,75
22	0,88	48	0,75
23	0,94	58	0,82
25	1	59	0,82
26	1	60	0,82
27	0,57	61	0,82
30	1		

Tabella 4 : Valore di K Multiplo del sistema dei laboratori che hanno impiegato il metodo Coggins

METODO COGGINS	
K MULTIPLO	0,85
LABORATORI PARTECIPANTI	23

Ripetibilità (accordanza)

In Tabella 5 sono riportati i laboratori e i sieri per i quali non è stata rilevata una accordanza qualitativa (positivo, negativo o non conclusivo) tra le due repliche analizzate con il metodo Coggins. I laboratori e i sieri non riportati hanno ottenuto una accordanza del 100% rispettivamente per tutti i sieri analizzati e per tutti i laboratori partecipanti. Si precisa che l'accordanza riporta una stima della precisione e non dell'accuratezza. Avere ottenuto un valore di accordanza pari a 100 per un siero significa solo che le due repliche hanno dato lo stesso esito, indipendentemente se questo fosse corretto o meno. In tabella 6 sono riportati i valori di accordanza rispetto allo score riportato per ogni siero con il metodo Coggins.

Tabella 5: Valori di accordanza qualitativa per laboratorio e per siero con il metodo Coggins. Non sono inclusi i laboratori ed i sieri con accordanza pari al 100% rispettivamente per tutti i sieri analizzati e per tutti i laboratori partecipanti.

		METODO COGGINS					
N° Siero		4	5	9	10	11	12-15
Score atteso		1/NI	1	1	0	0	0
N° Laboratorio	14	100	0	0	100	100	100
	18 a	100	0	0	100	100	100
	20	100	0	100	100	100	100
	23	100	100	0	100	100	100
	27	0	100	0	0	100	53,57
	31	100	100	100	100	100	53,57
	42	100	100	100	0	100	100
	45	0	100	100	100	100	100
	47	100	100	100	100	0	75
	48	100	100	100	100	100	75
	58	100	100	100	100	100	75
	59	100	0	100	100	100	100
	60	100	0	100	100	100	100
	61	100	100	0	100	100	100

Tabella 6: Valori di accordanza dello score per laboratorio e per siero con il metodo Coggins. Non sono inclusi i laboratori ed i sieri con accordanza pari al 100% rispettivamente per tutti i sieri analizzati e per tutti i laboratori partecipanti. I laboratori che non hanno riportato lo score sono contrassegnati da /.

		METODO COGGINS											
N° Siero		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12-15
Score atteso		4	2	2	1/NI	1	4	3	1	1	0	0	0
N° Laboratorio	14	0	100	0	/	0	100	0	100	0	100	100	100
	18 a	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100	100	100
	19	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100
	20	0	0	0	100	0	100	0	100	100	100	100	100
	22	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100
	23	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	100	100
	25	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	75
	26	0	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100	100
	27	100	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100	53,57
	30	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100
	31	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	100	53,57
	42	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100
	44	0	0	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100
	45	100	0	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100
	47	0	0	100	100	100	100	0	100	100	100	0	75
	48	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	58	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	59	100	100	100	/	0	100	100	100	100	100	100	100
60	0	100	0	/	0	100	0	0	100	100	100	100	
61	100	0	100	/	100	100	100	0	0	100	100	100	

Riproducibilità (concordanza)

In Tabella 7 e 8 sono mostrati rispettivamente i valori di concordanza qualitativa e rispetto allo score per siero e totale, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo Coggins.

Tabella 7: Valori di concordanza qualitativa, per siero e totale, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo Coggins. (NC= Non conclusivo)

METODO COGGINS		
N° Siero	Score Atteso	Concordanza
1	4	100
2	2	100
3	2	100
4	1/NI	52,17
5	1	62,80
6	4	100
7	3	100
8	1	100
9	1	55,07
10	0	60,58
11	0	62,80
12-15	0	96,32
Concordanza totale		64,60

Tabella 8: Valori di concordanza rispetto allo score, per siero e totale, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo Coggins. (NC= Non conclusivo)

METODO COGGINS		
N° Siero	Score Atteso	Concordanza
1	4	54,82
2	2	42,04
3	2	42,51
4	1/NI	55,26
5	1	45,30
6	4	81,77
7	3	40,19
8	1	37,40
9	1	42,28
10	0	62,83
11	0	65,51
12-15	0	96,54
Concordanza totale		39,79

Percentuali di errore

In Tabella 9 sono mostrate le percentuali di errore su ciascun siero e complessiva per il metodo Coggins.

Tabella 9: Percentuali di errore, su ciascun siero e complessiva, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo Coggins. (NC= Non conclusivo)

N° Siero	RISULTATO ATTESO	%ERRORE
1	POSITIVO	0
2	POSITIVO	0
3	POSITIVO	0
4	POSITIVO/ NC	2,2
5	POSITIVO	23,9
6	POSITIVO	0
7	POSITIVO	0
8	POSITIVO	0
9	POSITIVO	32,6
10	NEGATIVO	26,1
11	NEGATIVO	23,9
12-15	NEGATIVO	3,8
% di errore complessiva		8,3

Metodo OIE

K di Cohen e K multiplo

In Tabella 10 sono riportati i valori di K di Cohen per i laboratori che hanno impiegato il metodo OIE. In Tabella 11 è mostrato il numero di laboratori che hanno impiegato il metodo OIE e il valore di K multiplo.

Tabella 10 : Valori di K di Cohen dei laboratori che hanno impiegato il metodo OIE

METODO OIE			
N° LABORATORIO	K	N° LABORATORIO	K
1	1	53	1
3	1	54	1
4	1	55	0,94
5	0,94	56	1
10	0,94	59	0,82
11	1	60	0,82
12	0,88	61	0,82
15	0,88	62	0,83
16	0,76	63	0,82
17	1	64	0,94
33	0,88	65	0,82
49	1	66	0,59
51	1	69	1
52	1	70	1

Tabella 11 : Valore di K Multiplo del sistema dei laboratori che hanno impiegato il metodo OIE

METODO OIE	
K MULTIPLA	0,92
LABORATORI PARTECIPANTI	28

Ripetibilità (accordanza)

In Tabella 12 sono riportati i laboratori e i sieri per i quali non è stata rilevata una accordanza qualitativa (positivo, negativo o non conclusivo) tra le due repliche analizzate con il metodo OIE. I laboratori e i sieri non riportati hanno ottenuto una accordanza del 100% rispettivamente per tutti i sieri analizzati e per tutti i laboratori partecipanti. Si ricorda che l'accordanza riporta una stima della precisione e non dell'accuratezza. Avere ottenuto un valore di accordanza pari a 100 per un siero significa solo che le due repliche hanno dato lo stesso esito, indipendentemente se questo fosse corretto o meno.

In tabella 13 sono mostrati i valori di accordanza rispetto allo score riportato per ogni siero con il metodo OIE.

I risultati diversi da 100 sono evidenziati con sfondo celeste.

Tabella 12: Valori di accordanza qualitativa per laboratorio e per siero con il metodo OIE. Non sono inclusi i laboratori ed i sieri con accordanza pari al 100% rispettivamente per tutti i sieri analizzati e per tutti i laboratori partecipanti. (NI= Non inserito).

		METODO OIE								
N°siero		2	3	4	5	8	9	10	11	12-15
Score atteso		2	2	1/NI	1	1	1	0	0	0
N° Laboratorio	4	100	100	0	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	100	100	100	100	0	100
	10	100	100	100	100	100	100	100	100	75
	12	0	100	100	100	100	100	100	100	75
	16	100	100	100	0	100	0	100	0	75
	33	100	100	100	100	100	0	0	100	100
	55	100	100	100	100	100	0	100	100	100
	59	100	100	100	0	100	100	100	100	100
	60	100	100	100	0	100	100	100	100	100
	61	100	100	100	100	100	0	100	100	100
	62	100	100	100	100	100	100	100	0	75
	63	100	100	100	100	100	100	100	0	100
	64	100	100	100	100	100	0	100	100	100
	65	100	100	100	0	100	0	0	100	100
66	100	0	0	0	0	100	0	0	100	

Tabella 13: Valori di accordanza dello score per laboratorio e per siero con il metodo OIE. Non sono inclusi i laboratori ed i sieri con accordanza pari al 100% rispettivamente per tutti i sieri analizzati e per tutti i laboratori partecipanti. I laboratori che non hanno riportato lo score sono contrassegnati da /. (NI= Non inserito).

		METODO OIE											
N°siero		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12-15
Score atteso		4	2	2	1/NI	1	4	3	1	1	0	0	0
N° Laboratorio	3	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	5	100	100	0	100	0	100	0	100	100	100	0	100
	10	100	0	100	/	0	100	100	0	100	100	100	75
	11	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100
	12	100	0	100	/	0	100	100	0	100	100	100	75
	15	100	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100	100
	16	100	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	75
	17	100	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0
	33	100	100	100	/	100	100	100	100	0	0	100	100
	49	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	100	100
	51	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
	52	100	0	0	0	100	100	0	100	100	100	100	100
	53	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100
	54	100	100	0	0	100	100	100	0	100	100	100	100
	55	100	100	0	100	0	100	0	100	0	100	100	0
	56	100	100	100	0	100	100	100	0	100	100	100	100
	59	100	100	0	/	0	100	100	0	100	100	100	100
	60	0	100	0	/	0	100	0	0	100	100	100	100
	61	100	100	0	/	100	100	100	100	0	100	100	100
62	0	100	0	0	0	100	0	0	100	100	0	75	
63	0	100	0	0	100	100	100	100	100	100	0	100	
64	100	100	100	0	100	100	0	0	0	100	100	100	
65	100	100	0	0	0	100	0	100	0	0	100	100	
66	0	0	0	/	0	100	100	0	100	0	0	100	
69	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	
70	100	100	0	0	100	100	0	100	0	100	100	100	

Riproducibilità (concordanza)

In Tabella 14 e 15 sono mostrati rispettivamente i valori di concordanza qualitativa e rispetto allo score per siero e totale, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo OIE.

Tabella 14: Valori di concordanza qualitativa, per siero e totale, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo OIE. (NI= Non inserito).

METODO OIE		
N° Siero	Score Atteso	Concordanza
1	4	100
2	2	96,43
3	2	96,43
4	1/NI	53,25
5	1	77,73
6	4	100
7	3	100
8	1	96,43
9	1	58,44
10	0	89,68
11	0	83,18
12-15	0	98,23
Concordanza totale		75,47

Tabella 15: Valori di concordanza rispetto allo score, per siero e totale, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo OIE. (NI= Non inserito).

METODO OIE		
N° Siero	Score Atteso	Concordanza
1	4	61,71
2	2	38,32
3	2	36,90
4	1/NI	36,92
5	1	44,16
6	4	73,45
7	3	44,72
8	1	32,29
9	1	42,70
10	0	76,17
11	0	72,50
12-15	0	91,80
Concordanza totale		38,75

Percentuali di errore

In Tabella 16 sono mostrate le percentuali di errore su ciascun siero e complessiva per il metodo OIE.

Tabella 16: Percentuali di errore, su ciascun siero e complessiva, del sistema dei laboratori che utilizzano il metodo OIE. (NC= Non conclusivo)

N° Siero	RISULTATO ATTESO	%ERRORE
1	POSITIVO	0
2	POSITIVO	1,8
3	POSITIVO	1,8
4	POSITIVO /NC	0
5	POSITIVO	12,5
6	POSITIVO	0
7	POSITIVO	0
8	POSITIVO	1,8
9	POSITIVO	28,6
10	NEGATIVO	5,4
11	NEGATIVO	8,9
12-15	NEGATIVO	1,8
% di errore complessiva		4,5

DISCUSSIONE

Metodo Coggins

Il metodo Coggins è utilizzato da 23 laboratori del sistema degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS). Di questi, 11 hanno ottenuto un valore di K ritenuto accettabile ($\geq 0,81$) e 5 hanno ottenuto un K uguale ad 1.

I restanti 7 hanno ottenuto valori di K compresi tra 0,57 e 0,77.

Il **LAB 27** ha classificato come negativi quattro positivi e come positivi tre negativi.

Il **LAB 19** ha classificato come negativi quattro sieri positivi.

Il **LAB 59**, il **LAB 60** e il **LAB 61** hanno classificato come negativi tre sieri positivi.

Il **LAB 58** ha classificato come negativi due positivi e come positivo un negativo.

Il **LAB 14**, il **LAB 18 a** e il **LAB 22** hanno classificato come negativi due positivi.

Il **LAB 20** e il **LAB 23** hanno classificato come negativo un siero positivo.

Il **LAB 44**, il **LAB 45**, il **LAB 46** e il **LAB 47** hanno classificato come positivi quattro siero negativi.

Il **LAB 42** ha classificato come positivi tre sieri negativi.

Il **LAB 31** ha classificato come positivi due sieri negativi.

Il **LAB 48** ha classificato come positivi quattro sieri negativi.

Il **LAB 17** e il **LAB 55** hanno attribuito score 5 ai sieri negativi, invece di score 0.

Il **LAB 48** e il **LAB 58** non hanno inserito score per nessun siero, nonostante richiesto dal protocollo.

L'aumento di Laboratori con risultati non accettabili potrebbe essere attribuibile alla presenza nel pannello di campioni debolmente positivi non individuati, ad errori nell'esecuzione della prova, all'inserimento della valutazione quantitativa della positività attraverso l'attribuzione di un punteggio che, soprattutto nel caso di operatori non confidenti nella classificazione, può aver influenzato l'errata valutazione di campioni dubbi e negativi.

La presenza di incertezza nella classificazione dei campioni trova conferma nei bassi valori di accordanza tra le due aliquote di ciascun siero inserite nel pannello.

Sei sieri, per un totale complessivo di 20 coppie di risultati, sono stati classificati positivi in una replica e negativi nell'altra. In termini di score, un totale di 66 coppie di risultati non sono omogenei. Importante notare che 44 repliche di siero negativo sono state classificate come positive e 2 come non conclusive.

Analizzando il sistema dei laboratori, il K multiplo è risultato 0,85, sensibilmente inferiore al valore di 0,99 ottenuto con il CI del 2012; così come è risultato inferiore rispetto al precedente CI il valore di concordanza totale, 64,6% a livello qualitativo contro il 98,1% del 2012.

Mentre le discordanze qualitative sono limitate ad un numero ristretto di sieri con debole positività (4, il 5, il 9) o negativi (10 ed 11), per quanto riguarda lo score, le discordanze sono state osservate su sieri a differente grado di reattività, evidenziando una prevedibile incertezza nell'attribuzione del risultato.

In particolare, si raccomanda maggiore attenzione nell'interpretazione corretta della differenza tra una reazione negativa (siero che non forma né una linea di identità con l'Ag, né un incurvamento o interruzione della linea di precipitazione tra Ag e SPL, a cui deve essere attribuito uno score 0) e una reazione fortemente positiva (il siero la cui linea di precipitazione si presenta interrotta a circa la metà), corrispondente allo score 5, assente nei sieri del circuito.

La percentuale di errore complessiva riguardo al risultato qualitativo, è pari al 8,3 %. Tuttavia, analizzando il dato per singolo siero, si rileva che alcuni sono stati correttamente identificati da tutti i laboratori, per altri la percentuale di errore è inferiore al 4% (Siero 4 e Siero Negativo) e, infine, in altri casi le percentuali sono maggiori del 20% (Sieri 5, 10 e 11) o del 30% (Siero 9).

Inoltre, sembrerebbe che i Laboratori facenti capo ad un Istituto, abbiano impiegato per la classificazione dei campioni una tecnica differente da quella prevista dal CI, essendo stati restituiti sistematicamente come positivi in AGID campioni positivi solo al test ELISA. Il circuito è stato allestito per valutare la competenza tecnica e diagnostica con la tecnica AGID, quindi il risultato fornito con altre tecniche non rende possibile la valutazione dei laboratori.

Metodo OIE

Il metodo OIE è utilizzato da 28 laboratori del sistema degli IZZSS. 26 hanno ottenuto un valore di K ritenuto soddisfacente, maggiore o uguale a 0,81, dei quali 13 un K uguale ad 1. Si ritiene necessario sottolineare che cinque laboratori hanno ottenuto un valore di K uguale a 0,82, al limite dell'accettabilità. Due laboratori hanno ottenuto invece un valore di K di inferiore a 0,81 ritenuto insoddisfacente.

Il **LAB 66** ha riportato come negativi cinque sieri positivi e come positivi due sieri negativi.

Il **LAB 59**, il **LAB 60** e il **LAB 61** hanno riportato come negativi tre sieri positivi

Il **LAB 16** ha riportato come negativi due sieri positivi e come positivi due sieri negativi.

Il **LAB 63** e il **LAB 65** hanno riportato come negativi due sieri positivi e come positivo un siero negativo.

Il **LAB 15** ha riportato come negativi due sieri positivi.

Il **LAB 12** ha riportato come non conclusivo un siero positivo e come positivo un siero negativo.

Il **LAB 62** ha riportato come negativo un siero positivo e come non conclusivi due sieri negativi.

Il **LAB 33** ha riportato come negativo un siero positivo e come positivo un siero negativo.

Il **LAB 64** e il **LAB 55** hanno riportato come negativo un siero positivo.

Il **LAB 5** e il **LAB 10** hanno riportato come positivo un siero negativo.

Il **LAB 4** non ha inserito i valori di score.

Sebbene con un andamento migliore rispetto al metodo Coggins, anche per la prova OIE sono presenti criticità (2 laboratori con K insoddisfacente contro i 7 del metodo Coggins).

Infatti i valori di accordanza qualitativa evidenziano da un lato solo 15 laboratori su 28 (53,6%) con valori di accordanza diversi da 100 per tutti i sieri, contro i 14

su 23 (60,9%) del Coggins; ma dall'altro un numero maggiore di sieri (9 contro i 6 del Coggins) che hanno riportato risultati discordi.

Come già risultato per il metodo Coggins, l'accordanza in termini di score ha interessato tutti i sieri e la quasi totalità dei laboratori, confermando che questo metodo di classificazione ha bisogno di tempo ed esperienza per essere acquisito. Gli score riportati apparentemente sovrastimano lo score atteso.

Analizzando il sistema dei laboratori, il K multiplo è risultato 0,92, anch'esso inferiore rispetto al valore del CI 2012 (0,99); così come è risultato inferiore il valore di concordanza totale: 75,5% a livello qualitativo contro il 98,3% del 2012. Anche se i risultati diversi da 100 interessano un numero più elevato di sieri, i valori di concordanza sono maggiori rispetto al metodo Coggins, probabilmente per una più facile interpretazione di questo metodo.

Le percentuali di errore rispetto al Coggins sono minori sia complessivamente (4,5% contro 8,3%) sia per singoli sieri (solo un siero con percentuale di errore maggiore del 20% contro i quattro del Coggins). In particolare, i Sieri 10 e 11 (score atteso 0) sono stati riconosciuti quasi sempre correttamente in OIE, con una percentuale di errore rispettivamente del 5,4% e 8,9% contro il 26,1% e il 23,9 % del Coggins primo metodo.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni le attività di conferma eseguite presso il Centro di referenza, nonché di diagnostica di screening, hanno consentito di osservare un aumento della frequenza di sierii debolmente positivi (valori di score tra 1 e 2) rispetto a quella dei campioni con reazione fortemente positiva, questi ultimi forse più facilmente reclutabili ed allontanati attraverso le attività di sorveglianza.

Il presente CI è stato allestito con un pannello di campioni quanto più adeguato alla effettiva situazione di campo per valutare la sensibilità della rete dei laboratori rispetto alla realtà venutasi a determinare.

Anche se si rilevano performance peggiori rispetto al CI 2012, rispetto ad i parametri ed ai criteri di interpretazione scelti, nel suo complesso il sistema presenta una sensibilità accettabile con entrambi i metodi impiegati. Tuttavia, seppure la griglia di valutazione disponibile in letteratura per il K di Cohen consideri il limite di 0,81 accettabile, lo stesso valore non risponde agli obiettivi dei piani di controllo finalizzati all'eradicazione dell'infezione.

In generale, pertanto, le performance dei laboratori e la sensibilità del sistema necessitano di essere migliorate.

Per la soggettività di valutazione del test la fonte di errore che si considera predominante è l'errata interpretazione del risultato, motivo per cui, per incoraggiare i partecipanti ad un'analisi più accurata e attenta della reattività, è stata anche inserita la valutazione dello score. Tuttavia, in alcuni casi ciò potrebbe aver generato incertezze nella categorizzazione di alcuni sierii debolmente positivi o negativi.

Altre cause di errore, non direttamente individuabili, possono essere attribuite allo scambio di sierii, all'esecuzione delle prove in maniera non conforme rispetto alle procedure (preparazione del terreno, volumi dei sierii e dei reagenti dispensati) ed alla non corretta conservazione dei reagenti e terreni.

Anche il drastico calo dell'attività di sorveglianza degli ultimi due anni potrebbe aver influito sulle capacità degli operatori, generando per gli stessi una minore confidenza nella lettura ed interpretazione dei risultati.

Per far fronte a tale situazione si raccomanda l'impiego dell'ELISA come metodo di screening, effettuando in parallelo l'immunodiffusione solo se espressamente richiesta o prevista (movimentazioni internazionali) e l'esecuzione di tale metodo presso un numero limitato di laboratori per favorire l'omogeneità di valutazione dei risultati su di un maggior numero di campioni controllati.

Infine, considerate le numerose difformità osservate rispetto a quanto indicato, si raccomanda una maggiore attenzione al rispetto delle modalità di inserimento dei risultati e della restituzione completa delle informazioni accessorie previste.

I migliori risultati ottenuti dai laboratori che hanno effettuato le prove impiegando il metodo AGID OIE, suggeriscono un rapido adeguamento dell'intera rete verso questo, soprattutto in funzione degli scambi internazionali per i quali è indicato come "prescribed test". D'altra parte, certificazioni rilasciate con esiti espressi come Coggins test, ai sensi del DM Ministeriale 1976, rischierebbero di non essere adeguate rispetto agli standard richiesti.

L'esecuzione delle prove con tecniche non previste dal circuito può causare una diminuzione del K del laboratorio.

AZIONI CORRETTIVE

Ai laboratori che hanno ottenuto un valore di K inferiore a 0,81 si consiglia di verificare che tutto il processo di analisi per analizzare le possibili cause.

Il Centro di Referenza si rende inoltre disponibile a fornire un nuovo pannello di sieri i cui risultati dovranno essere restituiti per la valutazione e la risoluzione della non conformità.

APPENDICE I
PROVE DI OMOGENEITÀ

Tabella 17: Esiti qualitativi delle prove di omogeneità per il metodo Coggins

N°Siero	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	2	2	2	2	2	2	2	2
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 18: Esiti in termini di score delle prove di omogeneità per il metodo Coggins

N°Siero	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Moda Score
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4
7	3	3	3	3	3	3	3	3	3
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N°Siero	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	2	2	2	2	2	2	2	2
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 20: Esiti in termini di score delle prove di omogeneità per il metodo OIE

N°Siero	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Moda Score
1	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4
7	3	3	3	3	3	3	3	3	3
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0

PROVE DI STABILITÀ

Tabella 21: Esiti qualitativi delle prove di stabilità per il metodo Coggins

N°Siero	DOPO 15 GG A -20°C				DOPO 15 GG A +37°C			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	2	2	2	2	2	2	2	2
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 22: Esiti in termini di score delle prove di stabilità per il metodo Coggins

N°Siero	DOPO 15 GG A -20°C				DOPO 15 GG A +37°C			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
1	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	4	4	4	4	4	4	4	4
7	3	3	3	3	3	3	3	3
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 23: Esiti qualitativi delle prove di stabilità per il metodo OIE

N°Siero	DOPO 15 GG A -20°C				DOPO 15 GG A +37°C			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	2	2	2	2	2	2	2	2
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 24: Esiti in termini di score delle prove di stabilità per il metodo Coggins

N°Siero	DOPO 15 GG A -20°C				DOPO 15 GG A +37°C			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
1	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	4	4	4	4	4	4	4	4
7	3	3	3	3	3	3	3	3
8	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI

1. D.M. 4 dicembre 1976 Profilassi dell'anemia infettiva degli equini. Gazz. Uff. 31 dicembre 1976, numero 348.
2. Manuale OIE 2013, Cap 2.5.3 pag 3-4.
3. National Veterinary Services Laboratories SOP-EO-0101.02 "Agar Gel Immunodiffusion (Coggins) Test for Equine Infectious Anemia" pag.13
4. Cohen J. "A coefficient of agreement for nominal scales" Educational and Psychological Measurement 1960;20:37-46.
5. Fleiss JL. Measuring nominal scale agreement among many raters. Psychological Bulletin 1971; 76 (5):378–382.
6. JR Landis, GG Koch. The measurement of observer agreement for categorial data, Biometrics, Vol. 33, pp.159-174).
7. S.D. Langton, R. Chevennement, N. Nagelkerker, B. Lombard "Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance" International ,Journal of Food Microbiology 79 (2002) 175-181.
8. Issel CJ, Scicluna MT, et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. Vet Rec 2013; 172(8):210.