



**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 ELISA Anno 2015

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:

Medici Veterinari:

Dott. Gian Luca Autorino, e-mail: gianluca.autorino@izslt.it

Dott. Raffaele Frontoso, e-mail: raffaele.frontoso@izslt.it

Dott. Roberto Nardini, e-mail: roberto.nardini@izslt.it

Dott.ssa Ida Ricci, e-mail: ida.ricci@izslt.it

Dott.ssa Francesca Rosone, e-mail: francesca.rosone@izslt.it

Dott.ssa Maria Teresa Scicluna, e-mail: teresa.scicluna@izslt.it

Personale tecnico:

Sig.ra Daniela Caciolo

Sig.na Vania Corradi

Sig.ra Donatella Costantini

Sig.ra Antonella Denisi

Sig.ra Daniela Maccarone

Tabella di decodifica dei campioni inviati. Per ogni siero (confronta Tabella 4) è indicato il numero aliquota di ciascun laboratorio

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
LAB. 1	AV15	AV16	AV17	AV18	AV19	AV20	AV21	AV22	AV23	AV24	AV25	AV26	AV27	AV28	AV29	AV30	AV1	AV2	AV3	AV4	AV5	AV6	AV7	AV8	AV9	AV10	AV11	AV12	AV13	AV14
LAB. 2	AW14	AW15	AW16	AW17	AW18	AW19	AW20	AW21	AW22	AW23	AW24	AW25	AW26	AW27	AW28	AW29	AW30	AW1	AW2	AW3	AW4	AW5	AW6	AW7	AW8	AW9	AW10	AW11	AW12	AW13
LAB. 4	AX13	AX14	AX15	AX16	AX17	AX18	AX19	AX20	AX21	AX22	AX23	AX24	AX25	AX26	AX27	AX28	AX29	AX30	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5	AX6	AX7	AX8	AX9	AX10	AX11	AX12
LAB. 5	AY12	AY13	AY14	AY15	AY16	AY17	AY18	AY19	AY20	AY21	AY22	AY23	AY24	AY25	AY26	AY27	AY28	AY29	AY30	AY1	AY2	AY3	AY4	AY5	AY6	AY7	AY8	AY9	AY10	AY11
LAB. 6	AZ11	AZ12	AZ13	AZ14	AZ15	AZ16	AZ17	AZ18	AZ19	AZ20	AZ21	AZ22	AZ23	AZ24	AZ25	AZ26	AZ27	AZ28	AZ29	AZ30	AZ1	AZ2	AZ3	AZ4	AZ5	AZ6	AZ7	AZ8	AZ9	AZ10
LAB. 7	BA10	BA11	BA12	BA13	BA14	BA15	BA16	BA17	BA18	BA19	BA20	BA21	BA22	BA23	BA24	BA25	BA26	BA27	BA28	BA29	BA30	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8	BA9
LAB. 10	BB9	BB10	BB11	BB12	BB13	BB14	BB15	BB16	BB17	BB18	BB19	BB20	BB21	BB22	BB23	BB24	BB25	BB26	BB27	BB28	BB29	BB30	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	BB6	BB7	BB8
LAB. 11	BC8	BC9	BC10	BC11	BC12	BC13	BC14	BC15	BC16	BC17	BC18	BC19	BC20	BC21	BC22	BC23	BC24	BC25	BC26	BC27	BC28	BC29	BC30	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7
LAB. 12	BD7	BD8	BD9	BD10	BD11	BD12	BD13	BD14	BD15	BD16	BD17	BD18	BD19	BD20	BD21	BD22	BD23	BD24	BD25	BD26	BD27	BD28	BD29	BD30	BD1	BD2	BD3	BD4	BD5	BD6
LAB. 18B	BE6	BE7	BE8	BE9	BE10	BE11	BE12	BE13	BE14	BE15	BE16	BE17	BE18	BE19	BE20	BE21	BE22	BE23	BE24	BE25	BE26	BE27	BE28	BE29	BE30	BE1	BE2	BE3	BE4	BE5
LAB. 20	BF5	BF6	BF7	BF8	BF9	BF10	BF11	BF12	BF13	BF14	BF15	BF16	BF17	BF18	BF19	BF20	BF21	BF22	BF23	BF24	BF25	BF26	BF27	BF28	BF29	BF30	BF1	BF2	BF3	BF4
LAB. 26	BG4	BG5	BG6	BG7	BG8	BG9	BG10	BG11	BG12	BG13	BG14	BG15	BG16	BG17	BG18	BG19	BG20	BG21	BG22	BG23	BG24	BG25	BG26	BG27	BG28	BG29	BG30	BG1	BG2	BG3
LAB. 33	BH3	BH4	BH5	BH6	BH7	BH8	BH9	BH10	BH11	BH12	BH13	BH14	BH15	BH16	BH17	BH18	BH19	BH20	BH21	BH22	BH23	BH24	BH25	BH26	BH27	BH28	BH29	BH30	BH1	BH2
LAB. 35	BI2	BI3	BI4	BI5	BI6	BI7	BI8	BI9	BI10	BI11	BI12	BI13	BI14	BI15	BI16	BI17	BI18	BI19	BI20	BI21	BI22	BI23	BI24	BI25	BI26	BI27	BI28	BI29	BI30	BI1
LAB. 39	BJ1	BJ2	BJ3	BJ4	BJ5	BJ6	BJ7	BJ8	BJ9	BJ10	BJ11	BJ12	BJ13	BJ14	BJ15	BJ16	BJ17	BJ18	BJ19	BJ20	BJ21	BJ22	BJ23	BJ24	BJ25	BJ26	BJ27	BJ28	BJ29	BJ30
LAB. 40	BK30	BK1	BK2	BK3	BK4	BK5	BK6	BK7	BK8	BK9	BK10	BK11	BK12	BK13	BK14	BK15	BK16	BK17	BK18	BK19	BK20	BK21	BK22	BK23	BK24	BK25	BK26	BK27	BK28	BK29
LAB. 41	BL29	BL30	BL1	BL2	BL3	BL4	BL5	BL6	BL7	BL8	BL9	BL10	BL11	BL12	BL13	BL14	BL15	BL16	BL17	BL18	BL19	BL20	BL21	BL22	BL23	BL24	BL25	BL26	BL27	BL28
LAB. 42	BM28	BM29	BM30	BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	BM8	BM9	BM10	BM11	BM12	BM13	BM14	BM15	BM16	BM17	BM18	BM19	BM20	BM21	BM22	BM23	BM24	BM25	BM26	BM27
LAB. 43	BN27	BN28	BN29	BN30	BN1	BN2	BN3	BN4	BN5	BN6	BN7	BN8	BN9	BN10	BN11	BN12	BN13	BN14	BN15	BN16	BN17	BN18	BN19	BN20	BN21	BN22	BN23	BN24	BN25	BN26
LAB. 44	BO26	BO27	BO28	BO29	BO30	BO1	BO2	BO3	BO4	BO5	BO6	BO7	BO8	BO9	BO10	BO11	BO12	BO13	BO14	BO15	BO16	BO17	BO18	BO19	BO20	BO21	BO22	BO23	BO24	BO25
LAB. 45	BP25	BP26	BP27	BP28	BP29	BP30	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BP8	BP9	BP10	BP11	BP12	BP13	BP14	BP15	BP16	BP17	BP18	BP19	BP20	BP21	BP22	BP23	BP24
LAB. 46	BQ24	BQ25	BQ26	BQ27	BQ28	BQ29	BQ30	BQ1	BQ2	BQ3	BQ4	BQ5	BQ6	BQ7	BQ8	BQ9	BQ10	BQ11	BQ12	BQ13	BQ14	BQ15	BQ16	BQ17	BQ18	BQ19	BQ20	BQ21	BQ22	BQ23
LAB. 47	BR23	BR24	BR25	BR26	BR27	BR28	BR29	BR30	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	BR6	BR7	BR8	BR9	BR10	BR11	BR12	BR13	BR14	BR15	BR16	BR17	BR18	BR19	BR20	BR21	BR22
LAB. 48	BS22	BS23	BS24	BS25	BS26	BS27	BS28	BS29	BS30	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8	BS9	BS10	BS11	BS12	BS13	BS14	BS15	BS16	BS17	BS18	BS19	BS20	BS21
LAB. 49	BT21	BT22	BT23	BT24	BT25	BT26	BT27	BT28	BT29	BT30	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6	BT7	BT8	BT9	BT10	BT11	BT12	BT13	BT14	BT15	BT16	BT17	BT18	BT19	BT20
LAB. 50	BU20	BU21	BU22	BU23	BU24	BU25	BU26	BU27	BU28	BU29	BU30	BU1	BU2	BU3	BU4	BU5	BU6	BU7	BU8	BU9	BU10	BU11	BU12	BU13	BU14	BU15	BU16	BU17	BU18	BU19
LAB. 53	BV19	BV20	BV21	BV22	BV23	BV24	BV25	BV26	BV27	BV28	BV29	BV30	BV1	BV2	BV3	BV4	BV5	BV6	BV7	BV8	BV9	BV10	BV11	BV12	BV13	BV14	BV15	BV16	BV17	BV18
LAB. 54	BW18	BW19	BW20	BW21	BW22	BW23	BW24	BW25	BW26	BW27	BW28	BW29	BW30	BW1	BW2	BW3	BW4	BW5	BW6	BW7	BW8	BW9	BW10	BW11	BW12	BW13	BW14	BW15	BW16	BW17
LAB. 55	BX17	BX18	BX19	BX20	BX21	BX22	BX23	BX24	BX25	BX26	BX27	BX28	BX29	BX30	BX1	BX2	BX3	BX4	BX5	BX6	BX7	BX8	BX9	BX10	BX11	BX12	BX13	BX14	BX15	BX16
LAB. 56	BY16	BY17	BY18	BY19	BY20	BY21	BY22	BY23	BY24	BY25	BY26	BY27	BY28	BY29	BY30	BY1	BY2	BY3	BY4	BY5	BY6	BY7	BY8	BY9	BY10	BY11	BY12	BY13	BY14	BY15
LAB. 57	BZ15	BZ16	BZ17	BZ18	BZ19	BZ20	BZ21	BZ22	BZ23	BZ24	BZ25	BZ26	BZ27	BZ28	BZ29	BZ30	BZ1	BZ2	BZ3	BZ4	BZ5	BZ6	BZ7	BZ8	BZ9	BZ10	BZ11	BZ12	BZ13	BZ14
LAB. 58	CA14	CA15	CA16	CA17	CA18	CA19	CA20	CA21	CA22	CA23	CA24	CA25	CA26	CA27	CA28	CA29	CA30	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6	CA7	CA8	CA9	CA10	CA11	CA12	CA13
LAB. 59	CB13	CB14	CB15	CB16	CB17	CB18	CB19	CB20	CB21	CB22	CB23	CB24	CB25	CB26	CB27	CB28	CB29	CB30	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12
LAB. 60	CC12	CC13	CC14	CC15	CC16	CC17	CC18	CC19	CC20	CC21	CC22	CC23	CC24	CC25	CC26	CC27	CC28	CC29	CC30	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6	CC7	CC8	CC9	CC10	CC11
LAB. 61	CD11	CD12	CD13	CD14	CD15	CD16	CD17	CD18	CD19	CD20	CD21	CD22	CD23	CD24	CD25	CD26	CD27	CD28	CD29	CD30	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD6	CD7	CD8	CD9	CD10
LAB. 62	CE10	CE11	CE12	CE13	CE14	CE15	CE16	CE17	CE18	CE19	CE20	CE21	CE22	CE23	CE24	CE25	CE26	CE27	CE28	CE29	CE30	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE6	CE7	CE8	CE9
LAB. 64	CF9	CF10	CF11	CF12	CF13	CF14	CF15	CF16	CF17	CF18	CF19	CF20	CF21	CF22	CF23	CF24	CF25	CF26	CF27	CF28	CF29	CF30	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7	CF8
LAB. 69	CG8	CG9	CG10	CG11	CG12	CG13	CG14	CG15	CG16	CG17	CG18	CG19	CG20	CG21	CG22	CG23	CG24	CG25	CG26	CG27	CG28	CG29	CG30	CG1	CG2	CG3	CG4	CG5	CG6	CG7
LAB. 71	CH7	CH8	CH9	CH10	CH11	CH12	CH13	CH14	CH15	CH16	CH17	CH18	CH19	CH20	CH21	CH22	CH23	CH24	CH25	CH26	CH27	CH28	CH29	CH30	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6

INDICE

INTRODUZIONE	4
SCOPO DEL CIRCUITO	4
DESCRIZIONE DEL CIRCUITO	4
Adesione al circuito	4
Identificazione dei laboratori partecipanti	4
Riservatezza	4
Composizione, preparazione e fornitura dei campioni da esaminare	5
Composizione del pannello di campioni	5
Invio e conservazione dei campioni	8
Controllo di qualità	8
Test di omogeneità	8
Test di stabilità	8
Tipologia di prove ed espressione dei risultati	8
Valutazione dei risultati	9
RISULTATI	11
K di Cohen pesato e K multiplo	12
Ripetibilità	14
Riproducibilità	16
DISCUSSIONE	17
AZIONI CORRETTIVE	17
CONFRONTO TRA TECNICA AGID E TECNICA ELISA	18
RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI	21

INTRODUZIONE

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

Lo scopo del circuito è quello di monitorare nel tempo i livelli di competenza tecnica e diagnostica dei laboratori che effettuano sierodiagnosi di AIE mediante la tecnica ELISA, tecnica prevista dal Manuale OIE 2013, Cap 2.5.6 pag 2)¹.

DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

Adesione al circuito

La lettera di "Richiesta adesione Ring Test AIE" viene inviata tramite e-mail a tutta la rete di laboratori ufficiali che effettuano la sierodiagnosi dell'AIE. Nella comunicazione è indicato anche il termine di iscrizione. La comunicazione richiede conferma di ricevuta e di adesione con lo stesso mezzo, per attestare il passaggio dell'informazione.

Identificazione dei Laboratori partecipanti

Al fine di garantire la massima riservatezza, 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 dei 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 si possono identificare 2 gruppi di risultati qualitativi:

- 8 sieri classificati come negativi
- 22 sieri classificati come positivi, di cui quattro, con diversi range di reattività con i vari kit ELISA (chiamati sieri ad alta variabilità).

I sieri sono stati analizzati con il kit "In house" CTB ELISA, prodotto e validato dal CR e con i kit commerciali per i quali le ditte produttrici hanno fornito il materiale necessario all'allestimento del circuito.

I Kit utilizzati sono:

- Eradikit® EIAV Indirect ELISA In3Diagnostic®.
- ID Screen Equine Infectious Anemia Double Antigen IDVET.

Nelle Tabelle 1-3 sono riportati per ciascuno dei 15 sieri utilizzati e per ciascuno dei kit esaminati, l'esito atteso, sia dal punto di vista qualitativo (positivo/dubbio/negativo) che quantitativo. L'esito atteso quantitativo è stato determinato calcolando la media ± 2 deviazioni standard dei parametri di interpretazione del risultato di ciascun kit, per eliminare la variabilità delle densità ottiche (DO) dovuta alle diverse sedute in diversi laboratori. Per il CTB ELISA è stata utilizzata la percentuale di inibizione (PI), mentre per i restanti due il rapporto tra campione e siero positivo (S/P). I sieri negativi sono composti da siero equino Gibco®. In tabella 4, sono riportati per ciascun siero i numeri identificativi delle due aliquote derivanti. Per la corrispondenza tra i numeri aliquota sotto riportati e quelli dei pannelli inviati si rimanda al prospetto a pagina 2.

Per i Kit CTB ed ERADIKIT, due sieri (10 e 11) hanno rivelato durante le prove di omogeneità e stabilità, una variabilità elevata, che nel caso del primo kit comprendeva gli esiti di positività e di dubbio, mentre nel secondo comprendeva tutti i possibili risultati (positivo, dubbio e negativo). Per questi sieri, sono stati accettati come risultati corretti positivo o dubbio per il CTB o tutti i risultati possibili per l'ERADIKIT.

Tabella 1: Esito atteso (qualitativo e quantitativo) dei 15 sieri utilizzati per la composizione del pannello con il kit CTB ELISA. (PI= percentuale di inibizione; DS= deviazione standard)

N° SIERO	CTB ELISA			RISULTATO
	MEDIA PI	MEDIA -2DS	MEDIA +2DS	
1	96,43	94,18	98,68	POSITIVO
2	96,86	95,31	98,41	POSITIVO
3	96,20	93,61	98,78	POSITIVO
4	96,72	95,37	98,06	POSITIVO
5	94,55	90,69	98,42	POSITIVO
6	96,62	94,93	98,31	POSITIVO
7	96,14	93,17	99,12	POSITIVO
8	95,61	93,49	97,72	POSITIVO
9	95,83	85,42	106,23	POSITIVO
10	53,71	32,98	74,45	POSITIVO/DUBBIO
11	66,55	45,28	87,82	POSITIVO/DUBBIO
12	-3,54	-35,24	28,16	NEGATIVO
13	-3,54	-35,24	28,16	NEGATIVO
14	-3,54	-35,24	28,16	NEGATIVO
15	-3,54	-35,24	28,16	NEGATIVO

Tabella 2: Esito atteso (qualitativo e quantitativo) dei 15 sieri utilizzati per la composizione del pannello con il kit ERADIKIT. (S/P= rapporto siero/controllo positivo; DS= deviazione standard)

N° SIERO	ERADIKIT			RISULTATO
	MEDIA S/P	MEDIA -2DS	MEDIA +2DS	
1	253,19	226,92	279,46	POSITIVO
2	234,84	217,15	252,52	POSITIVO
3	234,66	192,35	276,98	POSITIVO
4	252,61	220,53	284,69	POSITIVO
5	277,14	255,04	299,24	POSITIVO
6	262,80	235,15	290,45	POSITIVO
7	213,49	166,37	260,61	POSITIVO
8	169,05	91,02	247,07	POSITIVO
9	98,44	75,40	121,48	POSITIVO
10	50,48	12,25	88,71	NEGATIVO/ DUBBIO/ POSITIVO
11	73,11	27,37	118,84	NEGATIVO/ DUBBIO/ POSITIVO
12	3,46	-4,61	11,53	NEGATIVO
13	3,46	-4,61	11,53	NEGATIVO
14	3,46	-4,61	11,53	NEGATIVO
15	3,46	-4,61	11,53	NEGATIVO

Tabella 3: Esito atteso (qualitativo e quantitativo) dei 15 sieri utilizzati per la composizione del pannello con il kit IDVET. (S/P= rapporto siero/controllo positivo; DS= deviazione standard)

N° SIERO	MEDIA S/P	IDVET		RISULTATO
		MEDIA -2DS	MEDIA +2DS	
1	146,53	109,09	183,97	POSITIVO
2	145,58	108,70	182,45	POSITIVO
3	145,95	107,14	184,77	POSITIVO
4	146,16	105,04	187,28	POSITIVO
5	146,48	107,84	185,11	POSITIVO
6	147,96	110,59	185,32	POSITIVO
7	149,99	109,82	190,15	POSITIVO
8	148,57	111,14	186,00	POSITIVO
9	149,63	110,22	189,04	POSITIVO
10	139,41	105,67	173,15	POSITIVO
11	135,72	105,89	165,55	POSITIVO
12	-2,31	-7,40	2,77	NEGATIVO
13	-2,31	-7,40	2,77	NEGATIVO
14	-2,31	-7,40	2,77	NEGATIVO
15	-2,31	-7,40	2,77	NEGATIVO

Tabella 4: Numeri aliquote derivanti dai 15 sieri utilizzati per la composizione del pannello.

N° SIERO	NUMERO ALIQUOTE DERIVANTI	
1	16	9
2	19	17
3	21	29
4	25	4
5	14	8
6	11	22
7	26	7
8	24	15
9	18	23
10	28	10
11	13	5
12	3	2
13	1	30
14	6	27
15	12	20

I sieri sono stati distribuiti in provette in aliquote da 0,18 ml e successivamente è stata valutata l'omogeneità e la stabilità dei campioni preparati, come riportato nel paragrafo "Controllo di qualità".

Invio e conservazione dei campioni

I campioni sono stati inviati tramite corriere; il CR ha informato anticipatamente via e-mail i laboratori partecipanti dell'invio dei campioni. I campioni sono stati consegnati dal corriere incaricato entro 5 giorni dalla data di invio.

I pannelli sono stati inviati alle Sedi Centrali degli Istituti che hanno provveduto a distribuirli alle rispettive sedi periferiche. Ciascun pannello è costituito da 30 campioni identificati progressivamente con un codice alfanumerico composto da una o più lettere seguite da un numero compreso tra 1 a 30.

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 30 volte con ciascuno dei kit
3. I valori di DO sono stati registrati e i sono stati calcolati i valori di PI ed S/P per i rispettivi kit.

Test di stabilità:

1. I sieri sono stati conservati a 37 ± 1 °C ed a -20 ± 5 °C.
2. Ogni aliquota è stata esaminata 30 volte con ciascuno dei kit
3. I valori di DO sono stati registrati e i sono stati calcolati i valori di PI ed S/P per i rispettivi kit.

Tipologia di prove ed espressione dei risultati

I campioni di siero sono stati esaminati secondo quanto previsto dalle procedure dei differenti kit impiegati.

Gli esiti sono stati espressi sia come risultato categorico (positivo, negativo, dubbio) che riportando nel "Modulo Risultati CI 2015 ELISA" i valori di DO. Il modulo, compilato in ogni sua parte, è stato inviato al CR via e-mail all'indirizzo: centroreferenzaaie@izslt.it.

Valutazione dei risultati

Per l'analisi statistica è stata valutata la concordanza mediante il calcolo del kappa di Cohen. Per i kit che prevedevano due risultati (positivo/negativo) è stata utilizzata la statistica K classica² mentre per i kit che prevedevano tre risultati possibili (positivo/negativo/dubbio) è stata utilizzata una statistica modificata chiamata K pesato³. Per valutare la concordanza del sistema dei laboratori partecipanti si è utilizzato il K multiplo⁴.

Il K di Cohen è una misura dell'accordo tra le risposte qualitative del laboratorio con l'atteso. 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 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.

Nel K pesato si pesa la differenza tra esito atteso e riportato attribuendo un valore numerico arbitrario (nel nostro caso 0,33) ai risultati che sono vicini all'atteso (es.: un campione positivo riportato come dubbio) dando un valore 0 ai risultati errati (positivo come negativo e viceversa).

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 ciascun laboratorio e ciascun kit, ed è stato inoltre calcolato il K totale del sistema dei laboratori.

I laboratori potranno valutare la propria attività secondo la griglia di valutazione proposta da Landis e Koch⁵, di seguito riportata (Tabella 5).

Tabella 5: 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

Il CR considera soddisfacente 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 il coefficiente di variazione (CV) calcolato sui parametri di interpretazione dei kit.

Il CV è definito come:

$$\frac{s}{\bar{X}} * 100$$

Dove s è la deviazione standard e X la media dei valori.

Il CV è stato calcolato per la doppia replica di ciascun siero per singolo laboratorio e sulla totalità delle repliche di ciascun siero per tutti i laboratori che hanno usato lo stesso kit. Il CV dei sieri negativi è stato calcolato considerando tutte le repliche insieme sia per i singoli sia per tutti i laboratori. Per il kit ERADIKIT, che prevede due protocolli di esecuzione con rispettivamente 5 e 25 µl di campione, è stato calcolato anche un CV totale per ciascun gruppo di laboratori che hanno utilizzato lo stesso protocollo. Per il kit VMRD, nel quale non è indicata una formula di interpretazione, al fine di standardizzare i risultati e poter calcolare i CV, è stata applicata la formula del calcolo del S/P = $(DO_{\text{campione}} - DO_{K-}) / (DO_{K+} - DO_{K-}) * 100$.

Sebbene non vi siano valori di accettabilità standardizzati, secondo la letteratura si ritiene accettabile un CV inferiore al 30%, eccetto nei casi in cui sia attesa una variabilità maggiore per le caratteristiche intrinseche della prova. Per i sieri negativi, il CV è molto elevato, ma questo dato è prevedibile essendo i valori dei parametri calcolati molto bassi^{6,7} (per le ELISA indirette il S/P e per le competitive il PI), anche se questa ampia variazione non influenza la correttezza dell'esito. Pertanto il CV dei sieri negativi non è stato considerato nella valutazione delle prove, pur presentando il dato nelle tabelle dei risultati.

È stata valutata anche la correttezza della corrispondenza tra il DO del campione e l'interpretazione del risultato secondo quanto previsto dal kit e l'inserimento dell'esito relativo.

RISULTATI

Al CI AIE ELISA 2015 hanno partecipato complessivamente 39 laboratori.

In tabella 6 è riportato il numero di laboratori che ha utilizzato ciascun kit. Per il kit ERADIKIT è riportato anche il numero di laboratori che hanno utilizzato il protocollo con 5 e 25 µl. Il laboratorio 20 ha utilizzato un metodo ELISA CTB modificato, non previsto dal protocollo del CI.

Tabella 6: Numero di laboratori che hanno utilizzato ciascun kit per l'esecuzione del CI AIE ELISA 2015

KIT	N°LABORATORI
CTB	10
ERADIKIT (5 µl)	5
ERADIKIT (25 µl)	6
IDVET	8
VMRD	9
METODI ELISA NON PREVISTI DAL CI	1

K di Cohen pesato e K multiplo

Nelle Tabelle 7-10 sono riportati i valori di K di Cohen e il valore di K multiplo per ciascun kit utilizzato. Il laboratorio 20 ha ottenuto un K uguale ad 1 ma non è stato incluso nel calcolo del K multiplo.

In Tabella 11 è riportato il valore di K multiplo complessivo del sistema dei laboratori ed il numero di laboratori partecipanti.

Tabella 7: Valori di K di Cohen e K multiplo dei laboratori che hanno utilizzato il kit CTB

	K
LAB 1	1
LAB 4	0,95
LAB6	1
LAB 18B	1
LAB 26	1
LAB 42	0,47
LAB 49	0,95
LAB 53	1
LAB 62	1
LAB 64	1
K MULTIPLO	0,94

Tabella 8: Valori di K di Cohen e K multiplo dei laboratori che hanno utilizzato il kit ERADIKIT

	K
LAB 2	1
LAB 5	1
LAB 10	1
LAB 11	1
LAB 12	0,85
LAB 58	1
LAB 59	1
LAB 60	1
LAB 61	1
LAB 69	1
LAB 71	1
K MULTIPLO	0,99

Tabella 9: Valori di K di Cohen e K multiplo dei laboratori che hanno utilizzato il kit IDVET

	K
LAB 7	1
LAB 40	1
LAB 41	1
LAB 50	1
LAB 54	1
LAB 55	1
LAB 56	1
LAB 57	1
K MULTIPLO	1,00

Tabella 10: Valori di K di Cohen e K multiplo dei laboratori che hanno utilizzato il kit VMRD

	K
LAB 33	1
LAB 35	1
LAB39	1
LAB 43	1
LAB 44	1
LAB45	1
LAB 46	1
LAB 47	1
LAB 48	1
K MULTIPLO	1,00

Tabella 11 : Valore di K Multiplo del sistema dei laboratori

N° LABORATORI	38
K MULTIPLO	0,98

Di seguito sono riportati in dettaglio i risultati non corretti riportati dai laboratori partecipanti:

Il **LAB 42** ha riportato 7 sieri positivi come negativi, 1 siero negativo come positivo ed un siero ad alta variabilità come negativo.

Il **LAB 12** ha classificato come negativi due sieri positivi, e ne ha anche riportato erroneamente i risultati sul modulo indicandoli come positivo e dubbio. Il laboratorio ha inoltre ha errato l'inserimento un altro siero (appartenente a quelli ad alta variabilità), attribuendo una positività a fronte di un risultato negativo.

Il **LAB 49** ha classificato un siero positivo/dubbio come negativo.

Il **LAB 61** ha solo inserito erroneamente il risultato di un siero ad alta variabilità, riportando positivo invece di negativo.

Il **LAB 71** ha inserito erroneamente il risultato di due sieri ad alta variabilità, riportando positivo invece che dubbio.

Per quanto riguarda i sieri ad alta variabilità (Sieri 10 e 11), si sottolinea che la moda dei risultati riportati dai laboratori coincide con l'esito atteso durante le prove preliminari (positivo con tutti i kit).

In tabella 12, sono riportati i valori di K di Cohen e di ripetibilità per siero del laboratorio 20 che ha utilizzato un metodo non contemplato nel CI.

Tabella 12: Valori di K di Cohen e di ripetibilità per siero del laboratorio 20

LAB 20	N° SIERO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12-15
	CV	0,56	0,56	0,10	0,66	0,05	0,10	0,41	0,20	0,15	11,35	4,01	-6,46
	K	1											

Ripetibilità

Nelle Tabelle 13- 16 sono riportati i CV per siero e per laboratorio per ciascun kit.

Tabella 13: Valori di CV per siero e per laboratorio dei laboratori che hanno utilizzato il kit CTB. In azzurro i valori dei sieri positivi superiori al 30%. I CV dei sieri negativi non sono stati considerati per la valutazione del laboratorio (vedi pag. 10).

N° SIERO	LAB 1	LAB 4	LAB 6	LAB 18B	LAB 26	LAB 42	LAB 49	LAB 53	LAB 62	LAB 64
1	0,03	0,23	0,20	2,53	0,18	0,45	0,35	0,11	0,34	0,00
2	0,00	0,23	0,04	0,33	0,63	135,59	0,00	0,04	0,08	0,17
3	0,06	0,11	0,20	0,05	0,49	321,69	0,49	0,08	0,10	0,17
4	0,37	0,40	0,12	0,05	0,21	467,76	0,35	0,00	0,03	0,06
5	0,31	0,11	0,16	0,24	0,36	0,90	0,32	0,19	0,08	0,06
6	0,25	0,17	0,39	0,14	0,11	110,92	0,69	0,04	0,05	0,62
7	0,40	0,06	0,31	0,47	0,14	494,47	0,10	0,08	0,03	0,96
8	0,15	0,06	0,00	0,00	0,00	505,11	0,07	0,00	0,11	0,06
9	0,09	0,34	0,00	0,05	0,46	134,24	0,07	0,19	0,00	0,73
10	4,71	5,06	2,11	2,90	0,93	-2733,01	20,52	2,29	7,25	3,36
11	4,00	87,38	1,51	3,64	0,85	12,90	7,71	1,16	3,93	0,92
12-15	39,42	26,68	50,09	-122,29	-179,98	-1805,03	-170,67	306,76	100,41	-8,19

Tabella 14: Valori di CV per siero e per laboratorio dei laboratori che hanno utilizzato il kit ERADIKIT (il numero in grassetto sotto il Numero LAB indica il protocollo utilizzato). In azzurro i valori dei sieri positivi superiori al 30%. I CV dei sieri negativi non sono stati considerati per la valutazione del laboratorio (vedi pag. 10).

N° SIERO	LAB 2 5	LAB 5 5	LAB 10 5	LAB 11 5	LAB 12 5	LAB 58 25	LAB 59 25	LAB 60 25	LAB 61 25	LAB 69 25	LAB 71 25
1	1,57	1,11	4,37	3,04	9,96	1,89	4,90	1,28	0,00	2,26	3,05
2	0,58	28,46	4,70	4,20	11,16	0,20	1,76	3,76	0,19	1,48	1,78
3	3,81	4,32	1,06	13,39	3,01	0,69	2,79	2,91	0,69	0,68	7,82
4	4,48	1,72	1,87	3,65	1,43	1,91	10,53	3,15	0,52	0,69	1,72
5	0,00	1,51	2,17	11,42	0,05	0,48	9,14	2,30	1,76	6,82	0,35
6	0,22	5,00	0,11	0,52	5,88	1,21	9,22	2,62	0,38	3,65	0,04
7	3,17	16,90	4,25	58,68	5,16	4,96	7,96	1,84	1,75	5,72	1,29
8	10,04	24,95	2,96	12,42	3,39	6,55	2,62	6,21	1,96	2,55	1,87
9	5,59	2,01	12,52	15,92	18,18	4,38	10,73	0,91	0,74	1,11	0,80
10	15,69	1,61	1,30	5,26	27,51	2,39	2,13	13,61	14,38	2,73	6,97
11	4,49	37,33	0,49	23,72	14,93	1,21	1,69	0,65	51,69	6,26	9,60
12-15	10,77	64,54	27,62	62,64	74,41	26,94	125,70	16,92	6,64	15,45	14,86

Tabella 15: Valori di CV per siero e per laboratorio dei laboratori che hanno utilizzato il kit IDVET (le caselle contrassegnate con / sono relative ai sieri per i quali è stato riportato un valore di OVER, superiore al valore massimo leggibile da lettore spettrofotometrico, per questi sieri non è possibile calcolare il CV). I CV dei sieri negativi non sono stati considerati per la valutazione del laboratorio (vedi pag. 10).

N° SIERO	LAB 7	LAB 40	LAB 41	LAB 50	LAB 54	LAB 55	LAB 56	LAB 57
1	0,00	0,79	3,85	0,00	2,91	/	/	/
2	0,00	1,82	3,64	0,00	1,14	/	/	/
3	5,62	3,76	0,59	0,00	1,24	/	/	/
4	4,13	2,69	2,63	0,48	0,28	/	/	/
5	3,22	8,14	2,65	0,09	0,42	/	0,92	1,08
6	0,00	0,43	3,38	0,00	0,63	/	/	/
7	0,52	4,10	1,33	0,00	18,32	/	/	/
8	0,00	2,07	3,25	15,98	3,79	/	/	/
9	0,74	0,43	1,18	0,87	0,89	/	/	0,51
10	3,79	4,34	3,06	5,02	19,28	2,07	2,36	1,23
11	3,29	4,62	5,80	10,64	3,33	0,29	1,85	3,38
12-15	206,87	-350,76	65,52	142,17	39,86	50,09	34,94	49,02

Tabella 16: Valori di CV per siero e per laboratorio dei laboratori che hanno utilizzato il kit VMRD. I CV dei sieri negativi non sono stati considerati per la valutazione del laboratorio (vedi pag. 10).

N° SIERO	LAB 33	LAB 35	LAB39	LAB 43	LAB 44	LAB45	LAB 46	LAB 47	LAB 48
1	3,33	1,30	4,66	17,52	2,76	0,47	0,33	7,72	7,11
2	0,47	3,79	0,31	0,18	6,32	0,53	9,67	12,38	0,06
3	6,61	4,17	1,30	3,73	11,32	6,06	1,73	1,47	2,16
4	2,65	2,61	2,12	3,22	9,89	9,12	0,23	4,88	4,34
5	5,48	2,65	0,53	3,08	6,07	5,32	13,01	14,97	7,08
6	1,08	0,57	1,59	5,93	16,77	1,90	0,26	16,10	1,79
7	2,14	2,55	0,23	0,43	13,27	3,68	7,90	4,37	12,90
8	2,25	2,75	3,36	8,42	25,28	1,39	1,05	10,45	1,22
9	4,03	4,45	1,09	3,32	5,49	0,95	2,76	15,62	1,51
10	17,33	4,48	8,08	11,26	18,08	21,32	6,70	15,10	3,94
11	3,73	5,31	16,22	8,10	6,32	13,37	2,67	0,83	4,35
12-15	233,53	221,53	-375,02	61,72	354,33	152,40	372,84	-84,46	441,57

Riproducibilità

In Tabella 17 sono riportati i CV complessivi tra tutti i laboratori per ciascun kit. Per il Kit ERADIKIT è stato calcolato un CV complessivo per ciascun protocollo e quindi un CV totale per tutti i laboratori che hanno utilizzato il suddetto kit.

Tabella 17: CV tra tutti i laboratori per ciascun kit. Per il Kit ERADIKIT è stato calcolato un CV complessivo per ciascun protocollo e quindi un CV totale per tutti i laboratori che hanno utilizzato il suddetto kit. In azzurro i valori dei sieri positivi superiori al 30%. I CV dei sieri negativi non sono stati considerati per la valutazione del laboratorio (vedi pag. 10).

N° SIERO	CTB	ERADIKIT 5 µl	ERADIKIT 25 µl	IDVET	VMRD
1	1,08	19,21	9,50	19,74	39,82
2	21,86	17,18	4,34	19,23	43,86
3	31,65	18,72	6,44	17,79	55,22
4	35,22	17,05	6,05	22,81	48,05
5	0,85	18,59	11,14	17,16	43,07
6	19,54	16,52	6,55	18,40	60,67
7	35,70	24,77	6,69	22,68	55,31
8	35,89	19,93	5,78	24,26	60,60
9	21,75	38,62	9,73	18,91	47,75
10	56,32	51,99	24,03	20,42	37,43
11	28,17	34,81	53,24	18,60	39,86
12-15	-662,47	69,47	50,24	191,33	343,28

DISCUSSIONE

L'esito complessivo del CI AIE 2015 ELISA è da ritenersi molto soddisfacente.

I valori di K complessivo sono classificabili come “Quasi perfetto” per la griglia di valutazione proposta. Riguardo all'errata classificazione di alcuni sieri, considerato il livello di standardizzazione dei kit ELISA, si consiglia di prestare particolare attenzione durante l'esecuzione della prova, l'analisi e l'inserimento dei risultati.

I valori di ripetibilità, simili per ELISA verso altri agenti infettivi^{8,9,10}, sono soddisfacenti, essendo la maggior parte dei CV inferiori a 30% e, molti tra questi, inferiori al 5%.

Le stesse valutazioni valgono anche per i CV di riproducibilità, più ampi rispetto ai CV di ripetibilità, per l'elevato numero di partecipanti, comunque conformi a quanto riportato in letteratura⁸.

Il kit VMRD, pur presentando il CV di ripetibilità basso, ha presentato un CV di riproducibilità superiore al 30%. Tuttavia, si sottolinea che lo scopo del CI è la valutazione delle performance dei laboratori e non dei prodotti diagnostici: motivo per cui non è previsto l'impiego di metodi non valutati preliminarmente dal CR.

Inoltre, si rammenta che nell'ambito diagnostico, anche in caso di prove eseguite correttamente, gli errori di calcolo o di interpretazione degli esiti, possono condurre alla perdita di casi a scapito della sensibilità dei sistemi di sorveglianza.

AZIONI CORRETTIVE

Ai laboratori che hanno ottenuto un valore di K ritenuto non soddisfacente, si consiglia primariamente di verificare il processo di analisi. Per la risoluzione delle non conformità si consiglia di richiedere un nuovo pannello di sieri per verificare anche la ripetibilità.

CONFRONTO TRA CI AGID E CI ELISA

Il CR ha organizzato i due CI, con il medesimo pannello di sieri, per confrontare l'accuratezza e la precisione dei laboratori che utilizzano le tecniche AGID ed ELISA.

In tabella sono confrontate le percentuali di errore rilevate mediante l'impiego delle due tecniche (e di entrambi i metodi AGID). Per l'ELISA, viene rappresentata la percentuale di errore in due colonne distinte di cui una non comprendente il LAB 42 che ha effettuato errori sistematici, anche su sieri classificati sempre correttamente dagli altri laboratori, pertanto non coerenti con le performance complessive della rete diagnostica.

Tabella 18: Confronto tra le percentuali di errore rilevate con la tecnica AGID (metodo OIE e metodo Coggins) e tecnica ELISA. Per l'ELISA si presenta il dato totale e un dato epurato dal LAB 42.(NC= Non Conclusivo)

N° Siero	Score atteso AGID	AGID COGGINS	AGID OIE	ELISA	ELISA senza LAB 42
1	4	0	0	0,0	0,0
2	2	0	1,8	1,3	0,0
3	2	0	1,8	1,3	0,0
4	1/NC	2,2	0	1,3	0,0
5	1	23,9	12,5	0,0	0,0
6	4	0	0	1,3	0,0
7	3	0	0	1,3	0,0
8	1	0	1,8	1,3	0,0
9	1	32,6	28,6	3,8	2,6
10	0	26,1	5,4	3,8	1,3
11	0	23,9	8,9	1,3	1,3
12-15	0	3,8	1,8	0,3	0,0
% errore complessiva		8,3	4,5	1,4	0,2

Per i laboratori che hanno partecipato al solo CI AIE ELISA si riportano in Figura 1 le caratteristiche della reattività in AGID per ciascun valore di score e di seguito la relativa spiegazione.

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.

Dall'analisi si nota che i sieri con score in AGID di 3 o 4 sono stati identificati correttamente da entrambe le tecniche. Anche per i sieri con score 2 le percentuali di errore sono basse.

Le differenze maggiori si osservano per i sieri con debolmente positivi, con percentuali di errore superiori nell'AGID metodo Coggins (> 20%) rispetto all'OIE (< 10% - eccetto che per il siero 9) ed all'ELISA (< 5% - compreso il lab 42).

La probabilità di errore utilizzando la tecnica AGID è dalle 20 alle 40 volte maggiore rispetto a quella della tecnica l'ELISA (4,5/8,3 % contro 0,2 %), con una

grave riduzione della sensibilità del sistema diagnostico, quando venga utilizzata la sola immunodiffusione per lo screening dei campioni.

In sintesi, si può concludere che:

- Con la tecnica ELISA si ha una migliore accuratezza diagnostica e concordanza interlaboratorio.
- Il metodo AGID OIE, pur con percentuali di errore superiori all'ELISA, è più accurato e presenta valori di concordanza superiori del metodo Coggins.

Questi dati, congiuntamente ai risultati del confronto metodi ELISA condotto dal CR¹¹, che ne ha anche definito la maggior precocità nell'individuare anticorpi in soggetti recentemente infetti/vaccinati, richiamano la necessità del suo impiego come metodo di screening.

RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI

1. Manuale OIE 2013, Cap 2.5.6
2. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ. Psychol. Meas* 1960; 20: 37-46.
3. Cohen J. Weighed kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychological Bulletin* 1968;70 (4):213–220.
4. Fleiss JL. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bulletin* 1971; 76 (5):378–382
5. JR Landis, GG Koch. The measurement of observer agreement for categorical data, *Biometrics*, Vol. 33, pp.159-174).
6. Heck FC, Williams JD, et al. Interpretation of spectrophotometric adsorbance values to define results of enzyme-linked immunorbent assays. *J Clin Microbiol*, 1980; 11(4): 398-401.
7. Paré J, Simard C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can J Vet Res*. 2004;68(4):254-8.
8. Chung C, Wilson C, et al. Validation of an improved competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect Equine arteritis virus antibody. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25(6):727-35.
9. Colling A, Morrissy C, Barr J, et al. Development and validation of a 3ABC antibody ELISA in Australia for foot and mouth disease. *Aust Vet J*. 2014;92(6):192-9.
10. Paweska JT, Jansen van Vuren P, et al. Validation of an indirect ELISA based on a recombinant nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus for the detection of IgG antibody in humans. *R.J Virol Methods* 2007;146(1-2):119-24.
11. Relazione su: Confronto tra le metodiche ELISA disponibili in Italia per la sierodiagnosi di Anemia Infettiva Equina