

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013



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

CENTRO REFERENZA NAZIONALE Anemia Infettiva Equina (AIE)

RISULTATI CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE 2013

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

SCOPO DEL CIRCUITO

La realizzazione del CI serve a valutare la competenza tecnica dei singoli laboratori per la sierodiagnosi di AIE con la tecnica ELISA.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI SIERO

I campioni di siero scelti per il presente CI sono stati allestiti a partire da sieri equidi di collezione del CRAIE.

I sieri individuati come candidati sono stati esaminati con il kit "In house" CTB, in diluizioni scalari in base 2 o 3, partendo da una diluizione iniziale variabile da 1/3 fino a 1/18, scelta basandosi sui precedenti dati di reattività per i suddetti sieri.

Dopo aver costruito una curva di reattività, i sieri che presentavano una curva conforme a quella attesa, sono stati scelti per la costituzione del pannello. Per i campioni negativi è stato utilizzato un siero equino negativo GIBCO® la cui reattività è stata testata con tutti i kit.

Essendo la scelta del kit di utilizzare libera da parte dei laboratori partecipanti non è stato possibile allestire un pannello che, indipendentemente dal kit, avesse una scala di positività (debole positivo debole, positivo medio, positivo forte). Tuttavia, da prove interne al CRAIE, i sieri 1 2 e 3 sono risultati con una reattività positiva debole.

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

CONTROLLO DI QUALITÀ DEI CAMPIONI DI SIERO

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

Test di omogeneità:

1. Ogni campione di siero è stato suddiviso in aliquote.
2. Ogni aliquota è stata esaminata con tutti i kit ELISA disponibili in commercio e con l'ELISA "in house" del IZS LT.

Test di stabilità:

1. I sieri sono stati conservati a 37 ± 1 °C ed a -20 ± 5 °C.
2. I pannelli sono stati esaminati con tutti i kit ELISA disponibili in commercio e con l'ELISA "in house" del IZS LT a 15 e 30 gg post conservazione per verificare la stabilità dei risultati.

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

Sono stati inviati 45 campioni di siero, allestiti a partire da 10 sieri positivi di collezione disponibili presso il CRAIE ed un serio equino negativo. Ad ogni siero sono stati attribuiti casualmente tre numeri compresi tra 1 e 45 (i 5 campioni negativi sono stati considerati come sieri separati). Successivamente è stata creata una numerazione diversa per ogni laboratorio.

In tabella 1 è riportato il riepilogo dei 15 sieri con la diluizione d'uso, il risultato atteso in ELISA e i numeri casuali attribuiti. Dai numeri riportati nelle ultime tre colonne, utilizzando la decodifica inviata contestualmente ai risultati, è possibile identificare la reattività attesa di ciascun siero esaminato.

Ai laboratori è stato richiesto di compilare un file excel riportando le DO dei controlli e di ciascun siero, e di inserire un risultato categorico nelle modalità previste dal kit.

Tabella 1: Riepilogo dei sieri utilizzati per il circuito interlaboratorio

NUMERO SIERO	CATEGORIA	N° SIERI PANNELLO DERIVANTI DAL SIERO		
1	POS	44	6	19
2	POS	16	24	1
3	POS	23	10	2
4	POS	39	18	8
5	POS	7	13	38
6	POS	17	35	28
7	POS	9	32	29
8	NEG	30	33	3
9	POS	34	15	11
10	POS	37	21	12
11	POS	36	4	26
12	NEG	43	22	31
13	NEG	27	41	45
14	NEG	20	42	5
15	NEG	14	25	40

VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Per l'analisi statistica sono state valutate:

- Il coefficiente di variazione dei sieri per ogni laboratorio e per tutti i laboratori che abbiano utilizzato lo stesso kit.
- Il K di Cohen (pesato) e il K multiplo complessivamente e per ogni kit utilizzato, i loro intervalli di confidenza al 95% e la loro significatività statistica.
- L'accordanza e concordanza per ogni siero e per kit, oltre alla concordanza totale.

Sono state calcolate inoltre le percentuali di risultati errati per ogni siero considerando complessivamente tutti i kit.

Coefficiente di variazione (CV)

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

Il principio su cui si basa ciascuna ELISA, determinerà che la DO dei positivi sia molto bassa nei kit di tipo competitivo e alta in quelli di tipo non competitivo. Viceversa accadrà per i negativi. I valori molto vicini al limite inferiore di rilevabilità dello spettrofotometro, risentiranno quindi di una maggiore variabilità e di conseguenza è prevedibile che il CV sia maggiore.

Per ovviare a queste differenze, è stato calcolato il CV non sul valore di DO ma sui valori standardizzati come da indicazioni riportate da ciascun kit per l'interpretazione del risultato, in modo tale che venisse annullato l'effetto di variabilità tra le diverse prove. Per i kit che non indicavano nessun criterio è stato scelto di valutare il rapporto tra DO del siero e media del controllo positivo.

Per il kit Eradikit è stato anche valutato il CV per entrambi i protocolli disponibili per l'esecuzione della prova.

In alcuni casi i risultati sono stati riportati come "over" o $>3,5$, visto che la DO risultava maggiore del range di lettura dell'apparecchio. In quei casi abbiamo inserito come DO il massimo del range. Per questo motivo in alcuni casi il CV risulta pari a 0.

Con queste correzioni, è risultato che i negativi mostrassero un CV maggiore in tutti i kit. I valori di CV dei negativi non sono stati considerati visto che i valori di DO ottenuti per questi sieri erano ampiamente al di sotto/sopra del valore di cut-off. Fonti bibliografiche [5] riportano come accettabile un CV di massimo 20%, anche se il livello di CV può essere settato in base alle esigenze.

Kappa di Cohen pesato e K multiplo

Il Kappa di Cohen è una misura dell'accordo tra le risposte qualitative di due osservatori (inter-observer variation) oppure del medesimo osservatore in momenti differenti (intra-observer variation), valutando gli stessi oggetti [1].

La formula proposta da Cohen standardizza la differenza tra proporzione totale osservata e proporzione totale attesa, dividendola per la massima differenza possibile non casuale.

La formula espressa matematicamente è la seguente:

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

Dove p_o è la proporzione di accordo osservato, mentre p_e è la proporzione attesa per effetto del caso.

La statistica Kappa pesata nasce con l'estensione dell'applicazione di tale statistica a variabili di tipo ordinale, e ha lo scopo di discriminare tra gradi diversi di disaccordo. Secondo questa logica, il disaccordo nell'attribuzione di un'unità a due categorie differenti è da ritenere, infatti, meno grave se le due categorie di attribuzione sono confinanti; è invece progressivamente più grave, quanto più le categorie di attribuzione sono distanti nella scala ordinale.

In seguito a questa considerazione, Cohen propone di introdurre nel computo della statistica kappa, dei pesi da assegnare alle celle in modo da esprimere la gravità o intensità del disaccordo [2].

Tali pesi possono assumere valori nell'intervallo [0-1] e devono essere tali che:

- alle celle di perfetto accordo, cioè quelle sulla diagonale principale, venga attribuito il massimo peso: 1;
- a tutte le celle di disaccordo venga assegnato un peso minore di quello massimo; maggiore o uguale a 0 e minore di 1;
- i pesi devono essere attribuiti in modo simmetrico rispetto ai due osservatori.

I pesi utilizzati nella seguente valutazione sono espressi in tabella 2.

Tabella 2: Pesi utilizzati nella statistica K pesata

Pesi assoluti statistica K pesata			
	Negativo	Dubbio	positivo
Negativo	1	0,33	0
Dubbio	0,33	1	0,33
positivo	0	0,33	1

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

Per la valutazione del laboratorio è stata utilizzata la griglia di valutazione del valore di K proposta da Landis e Koch, di seguito riportata in tabella 3 [3].

Tabella 3: Griglia di valutazione della concordanza

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

I laboratori potranno valutare la propria attività secondo i seguenti criteri mostrati in Tabella 4:

Tabella 4: Criteri di valutazione della prestazione dei laboratori

K < 0.81	Insoddisfacente
K ≥ 0.81	Soddisfacente

Per ottenere una valutazione complessiva del sistema dei laboratori che fanno sierodiagnosi di AIE è stato calcolato il K multiplo complessivo e per kit, ottenuti secondo il metodo proposto da Galli [4]. Per il kit Eradikit è stato anche valutato il K multiplo per entrambi i protocolli disponibili per l'esecuzione della prova.

Di ciascun valore di Kappa sono stati calcolati gli intervalli di confidenza, col il metodo proposto da Soliani [5] e la significatività statistica secondo il metodo proposto da Galli [4].

Accordanza e concordanza

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. In sintesi, per il metodo utilizzato possiamo dire che l'accordanza è il rapporto percentuale tra: il numero di coppie di risultati - per ciascun siero in esame - che, risultano concordi; e il numero totale di coppie possibili.

La concordanza è, per i dati qualitativi, l'equivalente della riproducibilità ed è definita come la probabilità che lo stesso campione inviato a due laboratori dia lo stesso risultato. Si può calcolare accoppiando ciascun risultato per un determinato siero con tutti i risultati, per quel siero, ottenuti dagli altri laboratori.

Per il loro calcolo è stato seguito il metodo proposto da Langton [6].

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

RISULTATI

Hanno partecipato al Circuito Interlaboratorio 39 Laboratori. Di seguito è riportato il dettaglio dei kit impiegati:

- Il kit "In House CTB" è stato utilizzato da 11 Laboratori.
- Il kit ERADIKIT è stato utilizzato da 12 laboratori.
- Il kit IDVET è stato utilizzato da 13 laboratori.
- Il kit VMRD è stato utilizzato da 8 laboratori.

Alcuni laboratori (10, 33, 35, 61, 69, 71) hanno utilizzato kit diversi o i due protocolli proposti per il kit ERADIKIT (P1: 5 µl/37°C; P2: 25 µl/T ambiente): il numero totale di serie di risultati analizzati è risultato quindi di 48.

Coefficiente di Variazione

Tabella 5: CV per siero dei laboratori che hanno utilizzato il kit CTB

NUMERO LABORATORIO												
N°SIERO	1	4	6	7	18	20	26	42	49	53	62	TOTALE
1	0,34	0,28	4,13	1,30	0,10	0,40	0,70	0,12	0,21	0,52	0,70	2,00
2	0,12	0,04	0,84	0,38	0,08	0,21	0,26	0,07	0,23	0,26	0,06	0,97
3	1,14	0,13	0,07	0,33	0,23	0,25	0,07	0,08	0,08	0,27	0,31	0,92
4	1,42	0,10	0,71	0,34	0,18	0,25	0,13	0,09	0,34	1,20	0,42	1,12
5	0,15	0,06	0,21	0,44	0,20	0,28	0,41	0,22	0,08	0,04	0,20	0,93
6	0,21	0,07	0,79	1,14	0,34	0,12	0,25	0,03	0,15	0,09	0,40	1,04
7	0,21	0,10	0,55	0,71	0,10	0,19	0,31	0,19	0,15	0,16	0,07	1,08
9	1,54	0,53	0,59	1,16	0,15	0,14	0,22	0,03	0,16	0,23	0,44	1,08
10	0,02	0,21	0,06	0,42	0,07	0,60	0,26	0,03	0,18	0,31	0,19	0,98
11	1,69	0,13	0,12	0,29	0,07	0,20	0,47	0,04	0,06	0,23	0,77	0,97

Tabella 6: CV per siero dei laboratori che hanno utilizzato il kit ERADIKIT P1

NUMERO LABORATORIO													
N°SIERO	2	5	10	33	35	39	58	59	60	61	69	71	TOTALE
1	4,5	2,8	12,1	28,4	14,2	16,4	4,6	13,5	8,9	1,2	7,0	12,1	19,9
2	5,5	2,9	8,1	1,2	16,0	6,7	9,5	6,2	9,2	9,8	2,3	3,6	13,7
3	2,6	4,8	7,8	3,8	4,6	1,8	3,6	0,4	3,3	7,4	6,4	0,9	12,2
4	3,6	6,9	1,9	7,2	9,4	6,1	1,1	6,7	3,1	4,5	7,3	8,5	10,6
5	5,4	3,6	21,7	21,5	7,1	7,7	6,2	7,6	3,2	8,1	5,3	8,0	14,0
6	2,1	5,3	8,8	33,8	8,0	6,8	14,0	5,0	7,2	9,4	16,9	10,1	18,4
7	1,4	4,5	4,1	5,5	5,4	0,9	2,9	8,5	2,8	0,1	9,1	2,4	13,4
9	3,4	2,1	1,1	2,7	12,5	5,8	5,3	3,7	2,5	10,8	8,7	3,6	13,2
10	0,8	2,9	1,2	4,4	5,3	4,2	16,9	9,0	1,7	7,7	5,1	1,3	11,2
11	0,4	4,4	13,9	5,6	6,1	2,9	0,5	4,5	0,9	1,1	7,6	3,6	12,9

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

Tabella 7: CV per siero dei laboratori che hanno utilizzato il kit ERADIKIT P2

NUMERO LABORATORIO					
N°SIERO	10	61	69	71	TOTALE
1	6,3	7,3	7,4	2,7	15,3
2	7,6	4,7	4,3	4,1	10,3
3	5,1	4,5	3,9	2,0	8,3
4	2,1	4,3	3,9	2,4	7,7
5	7,0	3,2	4,4	2,4	8,5
6	4,4	2,5	3,3	7,7	14,2
7	2,9	1,8	5,7	2,9	8,9
9	3,4	2,0	4,8	1,5	6,3
10	12,8	1,5	6,7	1,5	9,9
11	4,5	1,3	2,8	3,7	7,0

Tabella 8: CV per siero dei laboratori che hanno utilizzato li kit IDVET

NUMERO LABORATORIO														
N°SIERO	10	33	35	40	41	50	51	52	70	54	55	56	57	TOTALE
1	2,1	1,3	1,8	4,9	2,3	0,0	2,0	4,8	0,5	1,9	9,6	3,9	3,0	44,8
2	0,0	0,1	1,7	3,4	0,8	0,0	0,0	4,4	5,8	1,1	0,0	0,0	0,0	50,7
3	0,9	0,1	3,6	0,9	3,0	0,0	0,0	2,5	1,0	2,4	7,9	0,0	0,0	51,3
4	1,4	1,2	0,7	0,9	2,2	0,0	0,0	3,5	0,5	2,5	0,0	7,7	0,0	51,0
5	0,0	4,3	3,2	2,4	1,2	0,0	0,0	2,8	0,4	1,3	8,0	7,7	0,0	51,2
6	1,5	1,2	0,3	6,3	3,4	0,0	0,0	5,1	1,0	1,4	8,0	3,7	0,9	48,7
7	0,2	0,6	2,3	0,8	1,9	0,0	0,0	1,6	1,3	8,0	0,0	7,7	0,0	50,7
9	1,0	0,1	1,6	2,3	2,6	0,0	0,0	2,3	0,6	2,4	0,0	0,0	0,0	3,2
10	0,0	2,7	3,8	2,1	3,0	0,0	0,0	2,7	1,0	1,6	0,0	0,0	0,0	50,3
11	0,8	4,5	2,5	3,7	2,8	0,0	0,0	2,1	1,5	1,2	0,0	0,0	7,7	48,3

Tabella 9: CV per siero dei laboratori che hanno utilizzato il kit VMRD

NUMERO LABORATORIO									
N°SIERO	33	35	43	44	45	46	47	48	TOTALE
1	22,3	7,6	10,1	8,9	14,4	3,5	22,7	2,6	31,7
2	5,8	1,5	3,6	2,3	10,1	11,3	13,4	3,2	39,7
3	4,6	2,4	6,1	4,0	3,2	4,0	3,8	1,3	44,7
4	13,2	5,7	6,5	1,0	10,4	1,8	9,3	3,7	38,0
5	2,1	12,1	8,8	10,8	6,4	7,5	11,7	2,2	38,3
6	8,4	6,7	4,9	5,4	5,7	11,6	4,1	1,6	37,8
7	4,6	10,3	3,7	13,1	7,9	9,7	4,7	4,1	44,4
9	9,3	6,3	5,7	4,9	6,8	6,7	8,8	3,1	46,6
10	8,1	0,9	3,5	7,2	4,1	4,7	2,9	3,6	43,4
11	5,8	3,3	3,4	7,2	7,0	7,0	4,2	2,5	45,8

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

K di Cohen

Tabella 10: Valori di K pesato rispetto all'atteso per laboratorio

LAB	KIT	K pesato	LAB	KIT	K pesato
1	CTB	1	45	VMRD	1
2	ERADIKIT 37 °C	0,935	46	VMRD	1
4	CTB	1	47	VMRD	1
5	ERADIKIT 37°C	1	48	VMRD	1
6	CTB	1	49	CTB	1
7	CTB	1	50	IDVET	1
10	IDVET	1	51	IDVET	1
10	ERADIKIT 37°C	0,935	52	IDVET	1
10	ERADIKIT T AMB	1	70	IDVET	1
18	CTB	1	53	CTB	1
20	CTB	1	54	IDVET	1
26	CTB	1	55	IDVET	1
33	ERADIKIT 37°C	0,935	56	IDVET	1
33	IDVET	1	57	IDVET	1
33	VMRD	1	58	ERADIKIT 37 °C	1
35	ERADIKIT 37 °C	0,919	59	ERADIKIT 37°C	1
35	IDVET	1	60	ERADIKIT 37°C	0,967
35	VMRD	1	61	ERADIKIT 37°C	1
39	ERADIKIT 37 °C	1	61	ERADIKIT T AMB	1
40	IDVET	1	62	CTB	1
41	IDVET	1	69	ERADIKIT 37°C	0,967
42	CTB	0,967	69	ERADIKIT T AMB	0,967
43	VMRD	1	71	ERADIKIT 37°C	0,967
44	VMRD	1	71	ERADIKIT T AMB	1

K multiplo, Intervalli di Confidenza e significatività

Tabella 11: Valori di K, totale e per kit, e relativi intervalli di confidenza e significatività statistica

	NUMERO LAB	K	- IC 95%	+ IC 95%	Z	P
TOTALE	48	0,97	0,93	1,01	17,67	<0,005
CTB	11	1,00	0,97	1,02	172,94	<0,005
ERADIKIT P1	12	0,96	0,90	1,03	161,98	<0,005
ERADIKIT P2	4	0,99	0,91	1,07	345,79	<0,005
IDVET	13	1	1	1	161,17	<0,005
VMRD	8	1	1	1	223,95	<0,005

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

Accordanza e Concordanza

Tabella 12: Valori di accordanza per siero dei laboratori che non hanno ottenuto 1 per tutti i sieri

N° SIERO	2	10	22	35	42	60	69	69	71
	ERADIKIT P1	ERADIKIT P1	ERADIKIT P1	ERADIKIT P1	CTB	ERADIKIT P1	ERADIKIT P1	ERADIKIT P2	ERADIKIT P1
1	0,33	0,33	0,33	0	1	0,33	0,33	0,33	0,33
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	0,33	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	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	0,33	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabella 13: Valori di concordanza totale per siero per tutti i laboratori e per ciascun kit

N° SIERO	CONCORDANZA TOTALE	CTB	ERADIKIT	ERADIKIT P1	ERADIKIT P2	IDVET	VMRD
1	0,927	1	0,820	0,787	0,917	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1
6	0,993	1	0,979	0,972	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1
13	0,993	0,970	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

Le identificazioni errate sono state le seguenti:

- Il **LAB2** ha identificato come dubbi, con il kit Eradikit P1, i sieri 6 e 44, che invece dovevano risultare positivi.
- Il **LAB10** ha identificato come dubbi, con il kit Eradikit P1, i sieri 19 e 44, che invece dovevano risultare positivi.
- Il **LAB 33** ha identificato come dubbi, con il kit Eradikit P1, i sieri 28 e 44, che invece dovevano risultare positivi.
- Il **LAB 35** ha identificato come dubbio, con il kit Eradikit P1, il siero 6 e come negativo il siero 44, che invece dovevano risultare positivi. Inoltre c'è stato un errore di compilazione del modulo in quanto è stato inserito come dubbio il siero 44 che invece, secondo i criteri di interpretazione del kit, è negativo.
- Il **LAB 42** ha identificato come dubbio, con il kit CTB, il siero 27, che invece doveva risultare negativo.
- Il **LAB 60** ha identificato come dubbio, con il kit Eradikit P1, il siero 44, che invece doveva risultare positivo.
- Il **LAB 69** ha identificato come dubbio, con il kit Eradikit P1 e P2, il siero 6 che invece doveva risultare positivo.
- Il **LAB 71** ha identificato come dubbio, con il kit Eradikit P1, il siero 44, che invece doveva risultare positivo.

Premesso che un siero dubbio verrebbe comunque inviato per conferma al Centro di Referenza, mantenendo invariata la sensibilità del sistema, le non corrette classificazioni sono state correttamente valutate con il K pesato, e sono considerate un errore di lieve entità. In conseguenza di questa considerazione in tabella 14 sono mostrate le percentuali di errore sia nel caso in cui il siero positivo identificato come dubbio venga considerato errato, sia nel caso in cui venga accettato.

Tabella 14: Percentuale di risultati errati per siero

SIERO	CATEGORIA	% DI ERRORE	% DI ERRORE (considerando accettabili i risultati dubbi per i sieri positivi)
1	POSITIVO	7,80	0,71
2	POSITIVO	0	0,00
3	POSITIVO	0	0,00
4	POSITIVO	0	0,00
5	POSITIVO	0	0,00
6	POSITIVO	0,71	0,00
7	POSITIVO	0	0,00
8	NEGATIVO	0	0,00
9	POSITIVO	0	0,00
10	POSITIVO	0	0,00
11	POSITIVO	0	0,00
12	NEGATIVO	0	0,00
13	NEGATIVO	0,71	0,71
14	NEGATIVO	0	0,00
15	NEGATIVO	0	0,00

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

VALUTAZIONE PROTOCOLLI KIT ERADIKIT

Nel Circuito Interlaboratorio 2013 sono state riscontrate delle differenze tra i due protocolli del kit ERADIKIT.

Considerati gli ottimi risultati sia in sede di validazione per il protocollo con 5 µl [7], ove il CV era risultato, molto inferiore (tra il 2 e il 4 %) rispetto a quello ottenuto nel Circuito 2013, sia relativamente alla spiccata precocità di rilevazione della sieropositività, ottenuta nella prova di confronto tra Kit ELISA disponibili in Italia [8], cui avevano partecipato solo i 10 laboratori delle Sedi Centrali degli IZZSS (in cui si registrava un CV comparabile con quello ottenuto nel CI2013), si può presumere che in questa circostanza la fonte di variabilità sia da ricondurre a problemi di precisione maggiormente influenzati dal ridotto volume.

Da notare, in ogni caso, che nessun siero positivo è risultato negativo con questo protocollo. In un'ipotetica situazione di routine i sieri dubbi, anche se non classificati chiaramente come positivi, sarebbero inviati al Centro di riferimento per conferma.

Si raccomanda pertanto una maggior precisione, in caso di utilizzo del protocollo con 5 µl o, diversamente di impiegare il protocollo che prevede la dispensazione di siero nel volume di 25 µl.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il CV sono dimostrati inferiori al 20% per tutti i kit tranne per il kit IDVET e VMRD nei quali superano anche il 50%. In questi due kit però, il CV di ogni siero all'interno di ciascun laboratorio è risultato molto ridotto; il valore elevato del CV complessivo è imputabile al fatto che i valori di PI o il rapporto $DO_{\text{Campione}}/DO_{\text{positivo}}$, hanno una variabilità interlaboratorio maggiore di quella intralaboratorio. Inoltre, il CV è solo una componente della valutazione della prestazione di un laboratorio, in particolare valuta la precisione. Questo parametro deve essere sempre accompagnato dalla valutazione dell'accuratezza, che nei Circuiti interlaboratorio è indagata tramite il K di Cohen, l'accordanza e la concordanza.

Rispetto a questi ultimi parametri di valutazione tutti i laboratori hanno ottenuto performance soddisfacenti per tutte le tecniche utilizzate. I valori di K multiplo sono risultati di 0,99 considerando tutti i laboratori, mentre, considerando i singoli kit il valore di K varia tra 0,97 a 1. Tutti i valori di K sono risultati altamente significativi e gli intervalli di confidenza collocano il valore di K tra 0,9 e 1.

L'accordanza per siero è risultata 0,33 per i sieri nn. 1, 6 e 13. Gli altri sieri hanno ottenuto una accordanza pari ad 1 in tutti i laboratori.

Le accordanze per singolo laboratorio, essendo state inviate solo tre repliche di ogni siero, hanno un significato relativo, in quanto non hanno un andamento lineare ma possono variare solo tra 0 (i tre risultati sono diversi), 0,33 (un risultato è diverso dagli altri due) e 1 (tutti i risultati sono identici), senza valori intermedi.

La concordanza totale per siero è compresa tra 0,92 e 1.

Il K di Cohen ottenuto con l'ELISA (0,97), sebbene in presenza di sieri positivi deboli, è risultato più elevato rispetto al circuito AIE AGID 2011, per il quale, sempre in presenza di sieri positivi deboli, i valori sono stati di 0,85 per il metodo Coggins e 0,78 per il metodo OIE [9]. La percentuale di errore nel 2013 è zero per 8 sieri su 10.

Confrontando le percentuali di errore sui sieri deboli con quelle ottenute nel 2012, vediamo che lo scorso anno per l'AGID sono state pari all'80,56% (metodo Coggins) ed al 78,75% (metodo OIE) e per per l'ELISA erano dell'1,52 %, nel 2013 in ELISA la percentuale si è ulteriormente ridotta allo 0,71%.

Sebbene nel 2013 non sia stato eseguito il Circuito in parallelo con l'AGID, ci si sarebbero potuti attendere dei risultati simili al 2012 data la presenza nel pannello 2013 di sieri debolmente positivi in AGID di difficile interpretazione [10].

CIRCUITO INTERLABORATORIO AIE - 2013

Considerata la necessità di aumentare la sensibilità del sistema di sorveglianza, soprattutto nelle condizioni di bassa prevalenza come quelle registrate a livello nazionale negli ultimi anni, i risultati ottenuti enfatizzano la necessità di utilizzare unicamente l'ELISA come metodo di screening, come anche contemplato dall'OIE [11], limitando alle sole movimentazioni internazionali l'utilizzo anche dell'AGID.

Tutto ciò anche in considerazione che i campioni che forniscono risultati non negativi ai test di screening sono, comunque, inviati per conferma al CR per le più approfondite valutazioni.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Cohen J. "A coefficient of agreement for nominal scales" *Educational and Psychological Measurement* 1960;20:37-46.
- [2] Cohen J. "Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit" *Psychological Bulletin* 1968; 70:213-20.
- [3] Landis J.R., Koch G. "The measurement of observer agreement for categorical data" *Biometrics* 1977;33:159-74.
- [4] Galli G. "Guida alla statistica nelle Scienze Radiologiche". Ecomedizioni Internazionali, Roma 2000.
- [5] Soliani L. "Manuale di statistica per la ricerca e la professione. Statistica univariata e bivariataparametrica e non-parametrica per le discipline ambientali e biologiche". Edizione Aprile 2005.
- [6] 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.
- [7] Validazione di un kit ELISA indiretto per le infezioni da Equine Infectious Anemia prodotto dal Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia (D.P.A.E.E.), Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino: report definitivo CRAIE 2012
- [8] Relazione su: Confronto tra le metodiche ELISA disponibili in Italia per la sierodiagnosi di Anemia Infettiva Equina CRAIE 2013
- [9] Risultati Circuito Interlaboratorio AGID per AIE Anno 2011.
- [10] Risultati Circuito Interlaboratorio AGID per AIE Anno 2012.
- [11] "Equine Infectious Anaemia" in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; Chapter 2.5.6 version May 2013.