



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



**Centro Referenza
Nazionale
Anemia Infettiva
Equina**

CIRCUITO INTERLABORATORIO

per AIE

Anno 2017

Tecnica ELISA

REPORT

ENTE ORGANIZZATORE: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA "M. ALEANDRI"
Centro Referenza Nazionale
Anemia Infettiva Equina
E-mail: centroreferenzaaie@izslt.it
Responsabile: Maria Teresa Scicluna
E-mail: teresa.scicluna@izslt.it

Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma
Tel. +39 06 79099315
Fax: +39 06 79340724

GRUPPO DI LAVORO:

Gian Luca Autorino
Raffaele Frontoso
Roberta Giordani
Roberto Nardini
Maria Teresa Scicluna

INDICE

SCOPO DEL CIRCUITO	4
DESCRIZIONE DEL CIRCUITO	4
Adesione al circuito	4
Identificazione dei laboratori partecipanti	4
Riservatezza	5
Composizione e distribuzione dei pannelli di sieri	5
Invio e conservazione dei campioni	5
Controlli di qualità: Test di omogeneità e stabilità	5
Espressione dei risultati	6
Valutazione dei risultati	7
RISULTATI	8
K di Cohen e K multiplo	10
DISCUSSIONE	14
AZIONI CORRETTIVE	15
RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI	15

SCOPO DEL CIRCUITO

In ottemperanza ai compiti assegnati, il Centro di Referenza per l'Anemia Infettiva degli Equini (CRAIE) organizza un circuito interlaboratorio (CI) per la sierodiagnosi dell'Anemia Infettiva degli Equini (AIE) mediante l'ELISA previsto come test di screening dal D.M. 2 febbraio 2016 - Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'anemia infettiva degli equidi¹. Lo scopo del circuito è quello di monitorare i livelli di competenza tecnica e diagnostica dei laboratori che effettuano la sierodiagnosi dell'AIE. Il kit utilizzato dai partecipanti deve essere compreso tra i lotti approvati dal CRAIE come indicato dal D.M. 2 febbraio 2016. In particolare si specifica che il kit CT prodotto e distribuito dal CRAIE non prevede l'impiego di piastre presensibilizzate, come quelle dei kit commerciali, rimandando tale fase ai laboratori utilizzatori.

Il presente documento illustra le modalità di organizzazione del circuito, di preparazione dei campioni, i criteri di valutazione delle prestazioni dei laboratori partecipanti e l'analisi e la valutazione dei risultati ottenuti.

DESCRIZIONE DEL CIRCUITO

Adesione

La lettera di "Richiesta adesione Ring Test AIE", nel quale è stato indicato anche il termine di iscrizione, è stata inviata tramite e-mail alla rete di laboratori ufficiali che eseguono la sierodiagnosi dell'AIE.

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 CRAIE, sia del laboratorio partecipante, dovrà fare riferimento al codice identificativo attribuito.

Riservatezza

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

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

Composizione e distribuzione del pannello di sieri

Il pannello di sieri del circuito ELISA è stato allestito a partire da 4 sieri a diverso grado di reattività definita dal kit in-house del CRAIE², ognuno dei quali distribuito in più repliche come da tabella 1, ai fini della valutazione della precisione.

Tabella 1: Composizione del pannello di sieri utilizzati nel circuito SP = strong positive; MP = medium positive; WP = weak positive e N = negative

Reattività	esito ELISA	n° di
SP	POSITIVO	7
MP	POSITIVO	7
WP	POSITIVO	7
N	NEGATIVO	9

Il siero WP deriva da un siero positivo di collezione diluito per reagire come tale in tutti i lotti dei kit ELISA approvati dal CRAIE e fortemente positivo in immunoblotting (IB), ma al limite della sua positività nell'Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID).

Invio e conservazione dei pannelli

I pannelli sono stati inviati con ghiaccio secco, ai Laboratori delle Sedi Centrali tramite corriere, previa comunicazione via e-mail.

Controlli di qualità: Test di omogeneità e stabilità

I sieri selezionati per il CI sono stati sottoposti ai test di omogeneità e di stabilità dopo distribuzione in provetta (aliquote da 0,12 ml) e successivo scongelamento.

Per ogni classe di reattività di siero sono state esaminate 14 aliquote, al fine di rilevare l' 1% di campioni non omogenei con il 95% di IC (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm),

Di queste, 6 sono state esaminate al tempo 0, mentre un gruppo di 4 aliquote, conservate a -20 ± 5 °C (temperatura prevista per la conservazione della matrice interessata), e un altro gruppo di 4 aliquote conservate a 37 ± 1 °C sono state esaminate al giorno 30.

Le aliquote hanno dato gli esiti attesi nelle prove di omogeneità e stabilità.

Espressione dei risultati

I sieri sono stati esaminati in ELISA con i lotti dei kit approvati³ dal CRAIE in conformità a quanto previsto dal D.M. 2 febbraio 2016 “Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'Anemia Infettiva degli Equidi”.

Gli esiti sono stati riportati nel Modulo “Risultati CI 2017 ELISA” e restituito entro la data di scadenza all'indirizzo e-mail: centroreferenzaiae@izslt.it.

Valutazione dei risultati

Per l'analisi statistica è stata valutata la concordanza mediante il calcolo del K di Cohen pesato⁴ e del K multiplo⁵. Il K pesato è stato introdotto per differenziare un errore di sensibilità rispetto ad un errore di specificità.

La valutazione del K di Cohen pesato è stata effettuata attribuendo i pesi come riportati nella tabella 2.

Tabella 2: Pesi attribuiti agli esiti per il calcolo del K di Cohen pesato

K	pesi assoluti statistica k		
esito atteso	N	D	P
N	1	-2	-2
D	0,8	1	0,5
P	0,8	1	1

Per la valutazione del laboratorio sono stati fissati i seguenti limiti di K:

$K < 0.9$ Insoddisfacente;

$K \geq 0.91$ Soddisfacente.

I risultati sono stati utilizzati sia per valutare la concordanza intra-laboratorio (precisione)⁶ e sia per valutare la concordanza rispetto all'atteso (accuratezza)⁶ per ciascun laboratorio per ogni livello di reattività.

La precisione è stata calcolata come rapporto tra il numero di coppie di risultati uguali sul totale delle possibili coppie.

Le combinazioni delle coppie sono state calcolate con la seguente formula:

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

Dove C corrisponde al numero di combinazioni possibili, n è il numero di risultati e k è il numero di risultati che formano ogni combinazione.

L'accuratezza è stata calcolata come il numero dei risultati corretti rispetto all'atteso sul totale dei risultati. Infine, è stata calcolata la percentuale di errore rispetto all'atteso per classe di reattività sul totale dei risultati forniti.

RISULTATI

Il pannello di sieri è stato distribuito a 44 laboratori. Nelle tabelle 3 e 4 è riportata la decodifica dei sieri distribuiti.

Tabella 3: Decodifica sieri SP e MP

CODICE LAB.	SP							MP							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	
1	A	291	1492	258	790	535	211	1499	1327	768	1416	1385	75	470	881
4	B	1160	672	1343	1175	317	1132	1127	835	1410	295	877	60	1079	1377
5	C	624	195	965	1273	1203	904	503	529	1044	945	408	224	1439	1334
6	D	19	1341	1431	684	1241	1152	10	1335	793	1072	721	1142	1155	1365
7	E	516	500	8	1229	820	1119	1147	507	1384	327	575	1361	988	544
10	F	1222	1398	297	322	39	289	1399	320	605	390	316	800	406	997
11	G	849	467	824	1316	1139	1007	1453	995	282	25	853	893	767	731
12	H	1179	221	85	394	359	562	657	977	1488	1225	873	294	310	1086
14	I	517	484	492	491	1219	1053	1394	556	431	986	761	62	412	1115
17	J	973	166	411	588	487	248	328	351	907	420	834	1373	434	1240
18	K	479	855	453	1087	502	396	807	1390	1475	26	966	1146	879	542
20	L	249	798	304	697	920	1434	645	1002	132	409	157	126	1220	1184
23	M	536	862	1200	371	293	828	1113	900	278	197	56	232	845	727
26	N	1427	471	184	815	325	1491	143	329	234	281	344	1455	633	150
33	O	1480	389	1125	643	312	44	937	649	763	716	1211	1201	1150	332
35	P	156	1107	427	690	914	683	1268	483	11	980	961	891	983	35
39	Q	896	161	118	124	1357	53	271	372	231	1282	740	674	1496	1251
40	R	1036	92	713	1311	99	1238	1481	5	804	1274	260	1256	1061	1009
41	S	1098	1167	660	635	1050	600	1313	681	557	1300	677	59	1242	666
42	T	1408	926	423	592	641	1059	728	661	1131	16	1333	149	1204	486
43	U	1011	478	77	709	207	300	1285	640	1165	1322	136	7	139	552
44	V	895	1462	298	1124	826	719	1085	1498	296	1397	992	338	306	387
45	W	1382	69	1299	465	993	433	1056	814	629	1338	1466	1411	1108	84
46	X	846	675	1122	357	257	127	14	968	214	90	703	1375	496	1387
47	Y	1043	715	1170	89	353	1024	534	1449	505	405	702	189	34	274
48	Z	1197	366	523	50	24	696	1350	1259	608	165	361	652	1321	1258
49	AA	1066	943	738	610	852	1486	613	776	739	743	1336	128	108	604
50	AB	38	844	1116	1227	1216	324	533	82	78	120	521	843	183	1294
51	AC	620	32	1424	41	109	978	292	712	222	140	1454	272	1280	392
52	AD	784	1291	1095	580	270	233	1345	187	1484	1332	1389	117	352	370
53	AE	186	55	1378	397	829	17	651	732	940	81	1463	769	878	1031
54	AF	720	31	1202	691	489	1169	1008	837	874	614	1138	1182	1432	1080
55	AG	70	906	598	1213	725	927	385	1071	1435	707	606	1340	792	1302
56	AH	859	964	1176	1193	386	962	1114	95	872	1077	506	976	758	228
58	AI	1303	1483	795	168	1262	72	1413	1143	785	1307	1310	960	268	537
59	AJ	991	694	817	22	1228	630	1405	1221	101	1010	1017	210	1379	689
60	AK	803	569	584	73	1263	1301	223	650	1281	213	1400	1452	174	1212
61	AL	1288	1278	287	1069	1003	553	1422	141	734	894	1417	1404	1494	802
62	AM	318	421	1208	868	1368	668	12	1275	1112	909	1047	1162	760	594
64	AN	918	1265	147	930	1317	1099	1324	1374	475	1187	1392	369	103	730
68	AO	766	241	664	794	29	1090	1359	1478	587	135	532	308	1181	637
69	AP	252	116	726	472	107	349	508	1034	888	243	1156	1	890	114
70	AQ	355	1257	426	593	473	52	622	286	1074	628	205	63	970	358
71	AR	1157	417	545	942	678	54	540	457	531	797	454	789	1052	779

Tabella 4: Decodifica sieri WP e N

CODICE LAB.	WP							N									
	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	
1	A	87	242	558	375	1048	1329	330	861	402	663	215	447	511	49	462	67
4	B	220	1123	367	169	1070	985	1376	151	299	251	382	230	1446	262	1188	530
5	C	443	256	1443	209	742	1428	1255	365	832	634	757	458	917	1284	522	963
6	D	1065	244	391	100	175	1111	654	621	1045	1230	1118	578	722	771	51	1458
7	E	1103	1401	339	901	667	1015	572	1363	1215	627	1286	550	283	158	30	1353
10	F	609	180	1433	212	204	102	363	1371	1314	302	1396	446	1349	925	1287	1289
11	G	979	595	658	718	1279	57	1266	599	15	346	724	981	723	1018	1100	857
12	H	1159	1456	43	1198	1441	1081	856	6	191	146	455	1136	3	848	276	373
14	I	1012	822	1019	1493	836	1178	347	1206	1141	1358	269	1128	1451	647	827	1252
17	J	916	1381	538	612	112	206	2	1348	23	866	1473	1476	235	655	488	850
18	K	698	1130	1418	1189	1459	1495	284	818	227	1082	812	218	884	345	564	928
20	L	309	1083	164	787	576	1319	1041	74	98	201	583	1479	364	1196	71	337
23	M	83	1121	782	882	957	686	680	1412	786	1261	305	687	589	1423	1233	190
26	N	290	577	1151	501	842	430	615	315	1126	393	407	648	938	148	1354	499
33	O	819	741	439	1295	1210	959	1239	541	1369	277	1062	155	1194	646	429	437
35	P	574	20	1402	1391	921	1023	121	1409	1186	253	319	1177	468	833	236	518
39	Q	865	692	1471	1234	176	154	543	400	799	440	1158	1372	1426	1276	208	1497
40	R	586	632	1250	28	498	1425	1245	354	1283	469	435	1290	591	582	947	772
41	S	110	1264	348	953	1058	96	178	1247	1174	549	932	753	342	398	1214	1395
42	T	1027	1386	303	482	950	192	561	902	1209	1064	1437	145	1030	1055	179	611
43	U	791	1218	425	47	1171	1355	1364	1367	37	1168	379	1040	1137	1344	1006	122
44	V	1021	806	748	80	240	929	239	403	494	546	490	1330	568	903	422	831
45	W	356	273	736	267	1000	182	1269	860	908	821	1362	808	1161	805	1253	105
46	X	1421	138	685	905	1102	708	1101	952	360	167	1005	746	86	1482	173	670
47	Y	737	495	1207	1076	448	752	1260	705	1356	1067	617	1092	1232	1016	915	1366
48	Z	863	781	1037	1243	1084	1292	456	229	1407	185	1304	566	1063	644	922	1297
49	AA	401	301	177	554	515	565	1014	460	1312	899	1025	638	497	388	334	1296
50	AB	194	480	1068	1305	1093	780	466	1120	948	876	751	384	9	160	414	602
51	AC	984	1148	1060	1467	1223	955	924	886	428	1430	1032	68	93	898	1489	1500
52	AD	280	323	1254	119	481	48	245	801	581	839	1293	1342	618	452	939	1033
53	AE	880	131	717	1306	264	1134	579	106	238	933	813	682	967	607	341	64
54	AF	203	163	669	889	585	129	567	1271	989	376	1237	923	1339	867	747	1477
55	AG	733	115	1190	1235	1195	601	998	1444	477	662	111	247	368	573	570	1450
56	AH	415	520	237	858	1406	1388	693	1487	749	809	504	774	764	1323	1038	378
58	AI	476	526	1469	700	777	1172	196	1106	1445	13	1049	1145	1094	91	1013	1224
59	AJ	1020	200	671	1326	1325	810	474	76	1039	1154	710	362	847	1236	1073	45
60	AK	1315	1415	548	326	1380	841	36	1318	560	676	590	1352	778	1474	969	97
61	AL	1383	571	750	883	1192	450	1370	65	1149	1460	1470	910	1485	935	1248	974
62	AM	1249	816	679	958	754	1191	559	759	936	263	418	279	701	377	1051	949
64	AN	1351	840	1461	755	399	1360	509	875	616	951	944	79	1046	830	461	1272
68	AO	744	311	1110	1331	123	226	563	1075	871	892	1153	1403	1270	88	1185	1117
69	AP	524	288	374	463	321	597	673	999	783	1429	442	1447	1088	66	1308	954
70	AQ	314	870	137	931	1109	313	1346	714	512	94	765	1144	659	340	46	254
71	AR	555	172	445	416	350	449	934	887	133	539	946	130	1180	729	438	897

Tabella 5: Numero di laboratori che hanno utilizzato ciascun kit per l'esecuzione del CI AIE ELISA 2017

KIT	N° di LABORATORI
CTB	14
ERADIKIT	13
ID VET	9
VRMD	7
KIT IZSLER	4

K di Cohen e K multiplo

Nelle Tabelle 6-11 sono riportati i valori di K di Cohen pesato e il valore di K multiplo per ciascun kit utilizzato.

Tabella 6: Valori di K di Cohen pesato e K multiplo dei laboratori che hanno utilizzato il kit CTB

COD. LAB	K
1 A	1
4 B	1
5 C	1
6 D	1
7 E	0,96
10 F	0,99
11 G	0,99
12 H	0,96
17 J	0,99
42 T	1
49 AA	1
53 AE	1
62 AM	1
64 AN	1
K MULTIPLO	0,99

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

COD. LAB		K
10	F	1
12	H	0,97
33	O	1
35	P	1
39	Q	1
40	R	1
54	AF	1
58	AI	1
59	AJ	1
60	AK	1
61	AL	1
68	AO	0,97
69	AP	1
71	AR	1
K MULTIPLO		1

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

COD. LAB		K
40	R	1
41	S	1
50	AB	1
51	AC	1
52	AD	1
54	AF	1
55	AG	1
56	AH	1
70	AQ	1
K MULTIPLO		1

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

COD. LAB		K
33	O	1
43	U	1
44	V	1
45	W	1
46	X	1
47	Y	1
48	Z	1
K MULTIPLO		1

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

COD. LAB		K
18	K	1
20	L	1
23	M	1
26	N	1
K MULTIPLO		1

Tabella 11: Valore di K Multiplo del sistema dei laboratori

N° DEI LABORATORI	43
K MULTIPLO	0,98

I valori di precisione ed accuratezza ottenuti sono risultati uguali ad 1, ad eccezione del siero WP e N per alcuni laboratori che hanno utilizzato il kit CTB ed ERADIKIT.

Nelle tabelle 12 e 13 sono riportati i valori di precisione e di accuratezza solo per i laboratori che hanno ottenuto valori inferiori ad 1.

Tabella 12: Valori di precisione ed accuratezza dei laboratori per il siero WP e per i laboratori che hanno utilizzato il kit CTB

		WP	
COD. LAB		precisione	accuratezza
7	E	0,52	0,71
10	F	0,71	0,86
11	G	0,71	0,86
12	H	0,52	0,71
17	J	0,71	0,86

Tabella 13: Valori di precisione ed accuratezza dei laboratori per il siero N e per i laboratori che hanno utilizzato il kit ERADIKIT

		N		
ERADIKIT	COD. LAB		precisione	accuratezza
	12	H	0,78	0,89
	68	AO	0,78	0,89

Nella tabella 14 sono riportate le percentuali di errore complessivo rispetto agli esiti attesi per classi di reattività di siero.

Tabella 14: Percentuale di errore complessiva rispetto agli esiti attesi per classe di reattività di siero

Reattività siero	Percentuale di errore
SP	0%
MP	0%
WP	2,13%
N	0,47%

Il siero WP ed il siero N hanno dato percentuali di errori rispettivamente del 2,13% e del 0,47%.

Il **LAB 14** non ha fornito gli esiti.

Quattro **LAB 10F, 12H, 33O, 40R e 54AF** hanno restituito gli esiti con due kit ELISA diversi. In tutti i casi i valori di k sono risultati superiori a 0,96 mentre i valori di precisione ed accuratezza inferiori ad 1 (LAB 10F e 12H) sono riportati nelle tabelle 12 e 13.

I **LAB 7E e il LAB 12H** hanno riportato come dubbi due repliche del siero WP mentre i **LAB 10F e il LAB 11G** hanno classificato come dubbi una replica del siero WP (gli errori sono stati riportati con il kit CTB).

Il **LAB 68AO** ha riportato come dubbio una replica del siero N. Inoltre il LAB **12H** ha riportato come Positivo una replica del siero N (errori con kit ERADIKIT).

DISCUSSIONE

Al circuito hanno aderito 44 laboratori di cui 43 hanno restituito gli esiti.

Quattro laboratori hanno restituito i risultati utilizzando due kit ELISA differenti.

Rispetto a quanto riportato nel protocollo operativo, essendo stato usato il K pesato, il valore di K^7 ritenuto soddisfacente è stato fissato a $\geq 0,91$.

La valutazione della concordanza è stata effettuata con il K pesato allo scopo di valutare in maniera diversa un difetto di sensibilità rispetto ad un difetto di specificità. Dei 43 laboratori che hanno riportato i risultati, 38 laboratori hanno ottenuto un valore di K pari ad 1 e cinque laboratori hanno ottenuto invece un valore di K inferiore a 1, ma comunque soddisfacente.

Analizzando la performance complessiva dei laboratori, il K multiplo è risultato 0,98 uguale al valore del ottenuto nel precedente CI AIE ELISA del 2014, dimostrando ancora che l'ELISA è una prova standardizzabile ed oggettiva.

Riguardo ai valori non corretti, riportati per alcune repliche dei sieri WP esaminati con il kit CTB, tenuto conto delle caratteristiche del kit come indicato a pagina 4, e trattandosi prevalentemente di laboratori che hanno iniziato ad utilizzare il kit CTB in occasione del circuito, è verosimile che gli scostamenti siano dovuti ad inesperienza di impiego.

Diversamente per i due errori di classificazione del siero N con il kit ERADIKIT, considerato il livello elevato di standardizzazione dell'esecuzione e dell'interpretazione dei risultati per i kit ELISA commerciali, è molto probabile che trattasi di errori dovuti all'esecuzione della prova.

In conclusione, si può considerare l'esito complessivo del CI AIE 2017 ELISA molto soddisfacente. Considerando che nessun siero positivo del presente circuito è stato classificato erroneamente come negativo, la sensibilità complessiva è risultata del 100% mentre la specificità ottenuta è risultata del 99,53%.

Riferendo i valori di sensibilità ottenuti con il presente CI all'attività di sorveglianza, che viene effettuata attraverso lo screening in ELISA, nessun campione sarebbe stato classificato come falso negativo, incluso il WP, il quale in AGID aveva una

positività al limite, confermando la validità dell'adozione del three tier system^{8,9} per la diagnosi sierologica dell'AIE.

AZIONI CORRETTIVE

Non richieste.

RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI

1. D.M. 2 febbraio 2016 "Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'anemia infettiva degli equidi" GU 26 aprile 2016 n. 96;
2. Nardini R, Autorino GL, Ricci I, Frontoso R, Rosone F, Simula M, Scicluna MT. Validation according to OIE criteria of a serologic competitive enzyme linked immunosorbent assay as screening method in surveillance programs for the detection of Equine infectious anemia virus antibodies. *J Vet Diagnostic Invest.* 2016; 28:88–97
3. Elenco dei lotti dei Kit AIE ELISA approvati dal CRAIE
http://195.45.99.82:900/elenco_kit.asp;
4. Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol. Bull.* 1968; 70: 213–20;
5. Fleiss JL. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol. Bull.* 1971; 76: 378–82;
6. S.D. Langton, R. Chevennement, N. Nagelkerker, B. Lombard. "Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: concordance and concordance" *International Journal of Food Microbiology* 79 (2002) 175-181;
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159–74;
8. Issel CJ, Scicluna MT, et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet Rec* 2013;

-
9. Scicluna MT, et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Vet Microbiol.* 2013; 165:123–34.