



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



**Centro Referenza
Nazionale
Anemia Infettiva
Equina**

CIRCUITO INTERLABORATORIO

per AIE

Anno 2017

Tecnica AGID

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	6
Controlli di qualità	
Test di omogeneità e test di stabilità	6
Espressione dei risultati	7
Valutazione dei risultati	7
RISULTATI	9
K di Cohen e K multiplo	10
DISCUSSIONE	14
AZIONI CORRETTIVE	16
RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI	17

SCOPO DEL CIRCUITO

In ottemperanza ai compiti assegnati, il Centro di Referenza per l'Anemia Infettiva Degli Equini (CRAIE) organizza un circuito di prove interlaboratorio (CI) per la sierodiagnosi dell'Anemia Infettiva degli Equini (AIE) mediante il test di Immunodiffusione in Gel di Agar (AGID), impiegato come previsto dal D.M. 2 febbraio 2016 - Piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo dell'anemia infettiva degli equidi¹. La prova è eseguita secondo la procedura OIE², capitolo 2.5.6, parte B 2.1.3 versione adottata nel maggio 2013.

Lo scopo del circuito è quello di monitorare i livelli di competenza tecnica e diagnostica dei laboratori che effettuano la sierodiagnosi dell'AIE.

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.

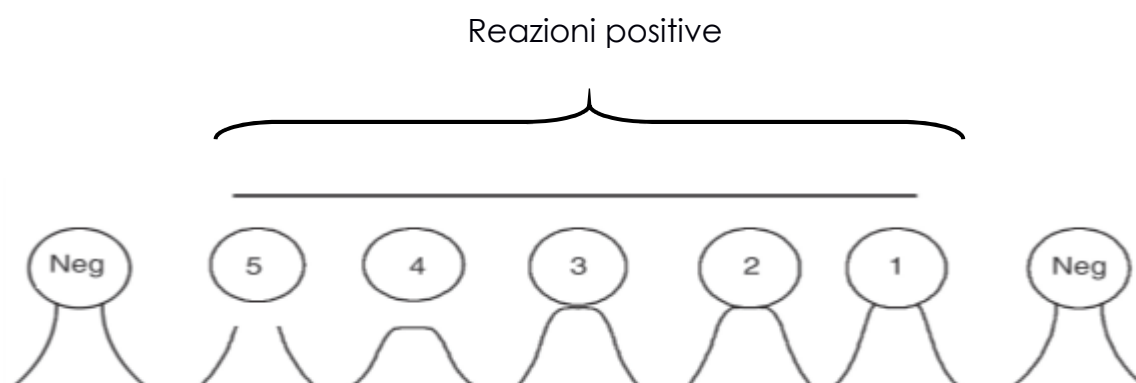
I risultati saranno messi a disposizione del Ministero della Salute e, se richiesto, ad enti terzi autorizzati, previa informazione per iscritto ai partecipanti al circuito.

Composizione e distribuzione del pannello di sieri

Il pannello di sieri del circuito AGID è stato allestito a partire da 5 sieri a diverso grado di reattività ognuno dei quali distribuito in 4 repliche.

A ciascun siero è stato assegnato un punteggio (score) secondo lo schema in Figura 1 proposto dal National Veterinary Services Laboratories (USDA)³.

Figura 1: Classificazione delle reattività in AGID con il punteggio (score), reazioni positive (1-5) e negativa (Neg).



La tabella 1 riporta l'esito atteso sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (score) dei sieri utilizzati per il circuito.

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

Reattività siero	Score atteso	n° di repliche
SP	4	4
MP	2	4
WP	1	4
VWP	0/1	4
N	0	4

Il siero VWP deriva da un siero positivo di collezione diluito per reagire positivo in ELISA e fortemente positivo in immunoblotting (IB), ma negativo o con score al limite di 1 in AGID.

Invio e conservazione dei pannelli

I pannelli sono stati inviati, in 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.

Sono stati esaminati un numero sufficiente di aliquote al fine di rilevare il 1% di campioni non omogenei con il 95% di IC (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

Per ogni classe di reattività di siero sono state esaminate 14 aliquote.

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 $+37 \pm 1$ °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 AGID secondo metodo OIE² e gli esiti sono stati espressi come risultato categorico (positivo o negativo) e come score di positività (0-5). Gli esiti sono stati riportati nel Modulo "Risultati CI 2017 AGID", 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 pesata	
	N	P
esito atteso		
N	1,00	-2,00
P	0,80	1,00

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

$K < 0.9$ Insoddisfacente;

$K \geq 0.91$ Soddisfacente.

I risultati quantitativi (score) 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 ad eccezione del siero VWP.

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.

Il calcolo della precisione ed accuratezza non è stato effettuato sul siero VWP in quanto è stato considerato accettabile sia l'esito negativo che positivo.

Infine, è stata calcolata la percentuale di errore rispetto all'esito qualitativo e quantitativo per classe di reattività sul totale dei risultati forniti.

Per il calcolo della percentuale di errore rispetto agli esiti quantitativi non sono stati considerati i laboratori che non hanno fornito l'esito in score.

RISULTATI

Il pannello di sieri è stato distribuito a 29 laboratori. Nella tabella 3 viene riportata la decodifica dei sieri distribuiti. I laboratori 14 e 42 non hanno restituito risultati.

Tabella 3: Decodifica sieri

SIERI CODICE LAB.	SP				MP				WP				VWP				N			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20
1	175	242	282	98	120	128	122	113	291	232	115	270	24	34	300	70	163	239	171	154
4	82	44	289	131	74	206	133	127	273	181	268	84	113	245	114	60	241	202	67	267
5	87	134	88	119	296	275	95	109	192	197	262	300	54	56	281	60	249	139	43	149
10	41	46	59	62	69	71	80	87	91	143	146	153	157	161	176	188	201	204	234	245
11	97	219	31	273	179	198	195	189	245	63	53	66	223	180	238	191	116	169	162	286
12	32	36	39	49	54	69	92	119	163	167	187	196	211	216	243	271	274	280	285	288
14	80	167	288	32	271	39	119	285	211	36	196	163	69	92	274	187	216	54	49	243
17	148	234	206	91	75	20	83	163	35	249	159	184	222	284	221	111	42	82	97	180
18	123	193	73	172	142	205	33	263	215	84	251	36	197	228	220	116	256	289	279	300
20	135	74	228	145	101	275	226	236	92	48	247	23	188	28	177	30	229	282	290	296
23	227	45	89	196	140	37	202	102	29	76	82	208	188	261	172	246	276	197	186	20
26	241	298	172	21	182	71	164	73	144	215	290	46	224	169	181	49	31	97	266	150
33	137	254	117	138	248	224	230	63	91	51	294	203	42	264	249	189	132	47	127	265
42	131	81	123	257	293	169	46	120	65	32	130	289	104	221	23	21	252	155	234	37
49 A	364	318	125	498	85	182	314	50	436	441	66	97	176	36	177	369	433	132	336	306
51	207	52	61	180	226	139	106	262	93	295	192	176	243	265	257	56	73	150	178	154
52	193	220	131	86	201	261	227	264	250	76	69	58	91	115	70	92	257	142	200	45
53	93	78	256	241	261	277	124	98	103	247	187	162	221	281	160	51	213	92	201	153
54	51	213	258	75	128	261	217	248	266	171	196	62	242	193	96	250	297	300	237	273
55	41	55	35	275	295	242	191	76	211	271	300	293	61	129	33	78	138	180	152	111
56	108	160	166	184	90	112	144	146	265	145	142	147	217	149	268	231	63	29	26	249
58	35	52	78	130	259	265	69	115	112	172	129	232	174	158	196	138	295	243	39	286
59	232	109	66	273	45	20	68	108	75	139	246	180	287	178	234	192	267	271	156	118
60	200	67	270	108	69	86	177	111	76	272	252	33	41	122	138	226	91	227	166	52
61	241	123	165	147	249	161	262	90	182	194	95	282	30	198	164	72	145	159	58	291
62	159	223	168	103	250	246	241	276	214	233	285	260	198	40	295	64	190	122	43	128
64	149	58	36	136	285	242	70	189	238	210	102	72	114	157	128	258	171	103	56	23
69	252	239	162	261	50	70	60	22	82	66	183	214	226	164	47	256	221	147	236	223
70	202	29	285	123	286	245	194	174	216	77	95	60	167	116	25	275	226	172	277	287

K di Cohen e K multiplo

In Tabella 4 sono riportati i valori di K di Cohen pesato ottenuti dai laboratori partecipanti. In Tabella 5 è riportato il valore di K multiplo.

Tabella 4: Valori di K di Cohen dei laboratori

CODICE LAB.	K	CODICE LAB.	K
1	1	52	1
4	1	53	1
5	1	54	1
10	1	55	1
11	1	56	1
12	1	58	1
17	1	59	1
18	0,38	60	1
20	1	61	0,82
23	1	62	1
26	0,82	64	1
33	1	69	0,82
49 NA	1	70	1
51	1		

Tabella 5: Valori di K Multiplo dei laboratori partecipanti

Metodo OIE	
K MULTIPLO	0,96
LABORATORI PARTECIPANTI	27

In tabella 6 sono riportati i valori di precisione e di accuratezza per ciascuna categoria di siero, eccetto quelli per il VWP, e per ciascun laboratorio rispetto agli esiti attesi espressi in score.

Tabella 6: Valori di precisione e accuratezza dei laboratori e per classe di reattività eccetto quelli per il VWP. I laboratori che non hanno riportato lo score sono contrassegnati da /.

CODICE LAB	SP		MP		WP		N	
	Precisione	Accuratezza	Precisione	Accuratezza	Precisione	Accuratezza	Precisione	Accuratezza
1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	0,33	0,50	1	1	1	1
10	1	1	0,50	0,25	0,17	0,50	1	1
11	1	1	1	0,00	0,33	0,50	1	1
12	1	1	0,33	0,50	0,50	0,75	1	1
17	/	/	/	/	/	/	/	/
18	1	1	0,17	0,50	0,17	0,25	1	1
20	1	1	0,33	0,50	0,50	0,25	1	1
23	1	1	0,33	0,50	0,33	0,50	1	1
26	1	1	0,50	0,25	0,17	0,50	1	1
33	1	1	0,33	0,00	0,17	0,25	1	1
49A	0,50	0,75	0,33	0,50	0,50	0,75	1	1
51	1	1	0,50	0,75	1	1	1	1
52	1	1	0,33	0,50	1	1	1	1
53	1	1	1,00	0,00	0,33	0,50	1	1
54	1	1	0,33	0,50	0,33	0,50	1	1
55	1	1	0,33	0,50	0,50	0,75	1	0
56	1	1	0,50	0,25	0,50	0,25	1	1
58	1	1	0,33	0,50	0,50	0,75	1	1
59	1	1	0,17	0,50	1	1	1	1
60	1	1	0,50	0,75	0,33	0,50	1	1
61	1	1	0,50	0,25	0,17	0,25	1	1
62	1	1	0,50	0,25	0,50	0,25	1	1
64	1	1	0,50	0,25	1	1	1	1
69	/	/	/	/	/	/	/	/
70	1	1	0,50	0,25	0,50	0,75	1	1

Nelle tabelle che seguono sono riportate le percentuali di errore rispetto agli esiti qualitativi che quantitativi per classi di reattività di siero. Dal calcolo della percentuale di errore non sono stati considerati i laboratori che non hanno fornito gli esiti in score.

Tabella 7: Percentuale di errore rispetto agli esiti attesi in score per classe di reattività siero

Reattività siero	Percentuale di errore
SP	1%
MP	57%
WP	37%
N	4%

Tabella 8: Percentuale di errore rispetto agli esiti qualitativi per classe di reattività siero

Reattività siero	Percentuale di errore
SP	0%
MP	1%
WP	5%
N	0%

Il siero VWP è stato classificato in 83,33% (tabella 9) delle aliquote come Negativo. I laboratori che hanno classificato il siero VWP positivo hanno sempre dato lo score di 1. Si precisa che nel caso del **lab 55** l'esito "Negativo" è stato per errore riportato come score "5". Come già riportato, per i laboratori **17** e **69** lo score per l'esito "Negativo" non è stato fornito.

Tabella 9: Esiti quantitativi riportati per il siero VWP

COD. LAB	1	4	5	10	11	12	17	18	20	23	26	33	49A	51	52	53	54	55	56	58	59	60	61	62	64	69	70
VWP	0	0	0	0	0	0	/	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	1	1	0	/	0
	0	0	0	0	0	0	/	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	/	0
	0	0	1	0	0	0	/	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	1	/	0
	0	0	1	0	0	0	/	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	0	/	0

Due laboratori, rispettivamente il **LAB 14** e **42** non hanno fornito gli esiti.

I **LAB 17** e **69** non hanno fornito l'esito in score ma solo qualitativo.

Il **LAB 18** ha riportato come negativi tre sieri positivi di cui uno MP e 2 WP.

I **LAB 26**, **61** e **69** hanno riportato come negativo un siero positivo (WP).

Tralasciando il siero VWP per il quale non è stata calcolata l'accuratezza e la precisione, i punteggi più bassi di precisione ed accuratezza hanno interessato i sieri con reattività MP e WP. Così come le percentuali più alte di errori per gli esiti quantitativi hanno coinvolto i sieri con reattività MP e WP. Diversamente per gli esiti qualitativi, gli errori hanno interessato quasi esclusivamente il siero WP.

DISCUSSIONE

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

Al circuito hanno aderito 29 laboratori di cui soltanto 27 hanno restituito gli esiti, due dei quali hanno fornito solo l'esito qualitativo.

Rispetto a quanto riportato nel protocollo operativo, essendo stato usato il K pesato, il valore di K 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 27 laboratori che hanno riportato i risultati, 23 laboratori hanno ottenuto un valore di K pari ad 1 e quattro laboratori hanno ottenuto invece un valore di K inferiore a 0,91, ritenuto insoddisfacente.

Analizzando la performance complessiva dei laboratori, il K multiplo è risultato 0,96, più alto rispetto al valore del CI 2014 (0,92).

Relativamente all'assegnazione degli score, per quanto riguarda i valori di precisione ed accuratezza, i valori più bassi sono stati registrati per i sieri con reattività MP e WP. Questo dato riconferma che questo metodo di classificazione, inserito nella valutazione delle performances dei laboratori con il CI 2014, ha ancora bisogno di esperienza per essere acquisito dai laboratori. Questa valutazione trova conferma anche nelle percentuali di errore complessivo riportate nella tabella 7, dove la percentuale più alta di errore si registra per gli esiti espressi in score.

Gli score riportati dai partecipanti sono risultati sistematicamente sovrastimati rispetto a quelli attesi.

Per quanto riguarda la percentuale di errore rispetto agli esiti qualitativi per classe di reattività di siero, il numero più alto di errori ha riguardato il siero WP.

Questo dato conferma ancora una volta che campioni WP positivi non sono agevolmente diagnosticabili in AGID. I motivi di tale situazione, che tuttavia non

possono essere valutati nell'ambito di questo CI, potrebbero essere legati all'esecuzione della prova, alla qualità dei reagenti impiegati e, soprattutto, alla soggettività della lettura.

Anche gli esiti complessivi per il siero VWP, siero reattivo in ELISA e positivo in IB, classificato dalla maggior parte dei laboratori come negativo (83,33% delle aliquote restituite come negative), confermano la validità dell'adozione del three tier system^{8,9} per la diagnosi sierologica dell'AIE al fine di aumentare la sensibilità ed efficacia della sorveglianza dell'AIE.

Tenuto conto che la piena attuazione della sorveglianza dell'AIE e il conseguente allontanamento dei capi positivi cronici, è molto probabile che per il futuro i nuovi positivi saranno per la maggior parte positivi incidenti o equidi con possibile bassa risposta immunitaria, cosiddetti "low responders"⁹.

Inoltre, ci si può attendere nel tempo una minore confidenza nella lettura ed interpretazione dei risultati da parte degli operatori, aumentando il margine di errata classificazione dei risultati, a causa della notevole riduzione dell'impiego dell'AGID in quanto metodo prescritto per le sole movimentazioni internazionali.

Se a questo si aggiunge il dato che gli equidi confermati positivi dal CRAIE sono per la maggior parte sieri con reattività compresa tra MP e WP risulta fondamentale associare l'ELISA all'AGID per colmarne il difetto di sensibilità anche per i controlli delle movimentazioni.

AZIONI CORRETTIVE

I laboratori che hanno ottenuto un valore di K inferiore a 0,91 devono verificare tutto il processo di analisi per analizzare le possibili cause.

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

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. "Equine Infectious Anaemia" in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Part 2, Section 2.5, Chapter 2.5.6
<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>;
3. National Veterinary Services Laboratories SOP-EO-0101.02 "Agar Gel Immunodiffusion (Coggins) Test for Equine Infectious Anemia";
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. Psychological Bull. 1971; 76: 378–82;
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. 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.