



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



Italian National  
Reference Centre  
for Equine Infectious  
Anaemia



OIE Reference Laboratory  
for Equine Infectious  
Anaemia

# *CIRCUITO INTERLABORATORIO*

per AIE

*Anno 2020*

*Tecnica AGID*

*REPORT*

---

**ENTE ORGANIZZATORE:** Centro Referenza Nazionale per l'Anemia  
Infettiva Equina  
OIE Reference Laboratory for Equine Infectious  
Anaemia  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle regioni Lazio e Toscana "M. Aleandri"  
Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma  
E-mail: [centroreferenzaaie@izslt.it](mailto:centroreferenzaaie@izslt.it)  
Responsabile: Maria Teresa Scicluna  
E-mail: [teresa.scicluna@izslt.it](mailto:teresa.scicluna@izslt.it)  
Tel. +39 06 79099449  
Fax: +39 06 79340724

---

**GRUPPO DI LAVORO:**

Alessia Altigeri  
Elisa Cammalleri  
Roberto Nardini  
Ida Ricci  
Francesca Rosone  
Massimiliano Simula  
Donatella Stilli

---

## Indice generale

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>SCOPO DEL CIRCUITO</b> .....	<b>4</b>
<b>DESCRIZIONE DEL CIRCUITO</b> .....	<b>4</b>
Adesione.....	4
Identificazione dei Laboratori partecipanti.....	4
Riservatezza.....	5
Composizione e distribuzione del pannello di sieri.....	5
Controlli di qualità.....	6
Test di omogeneità.....	6
Test di stabilità.....	6
Invio e conservazione dei pannelli.....	6
Espressione dei risultati.....	6
Valutazione dei risultati.....	7
<b>RISULTATI</b> .....	<b>8</b>
K di Cohen e K multiplo.....	8
Valutazione della reattività del siero (Risultato qualitativo e Score).....	9
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	<b>11</b>
<b>AZIONI CORRETTIVE</b> .....	<b>12</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....	<b>13</b>

---

## **INTRODUZIONE**

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 Equidi<sup>1</sup>. La prova è eseguita secondo la procedura OIE<sup>2</sup>, capitolo 3.5.6, parte B 2.1.3 versione adottata nel maggio 2019.

## **SCOPO DEL CIRCUITO**

Lo scopo del circuito è quello di monitorare i livelli di competenza tecnica dei laboratori che effettuano la sierodiagnosi di AIE mediante tecnica AGID.

Il presente documento illustra i risultati della valutazione delle prestazioni dei laboratori partecipanti.

## **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.

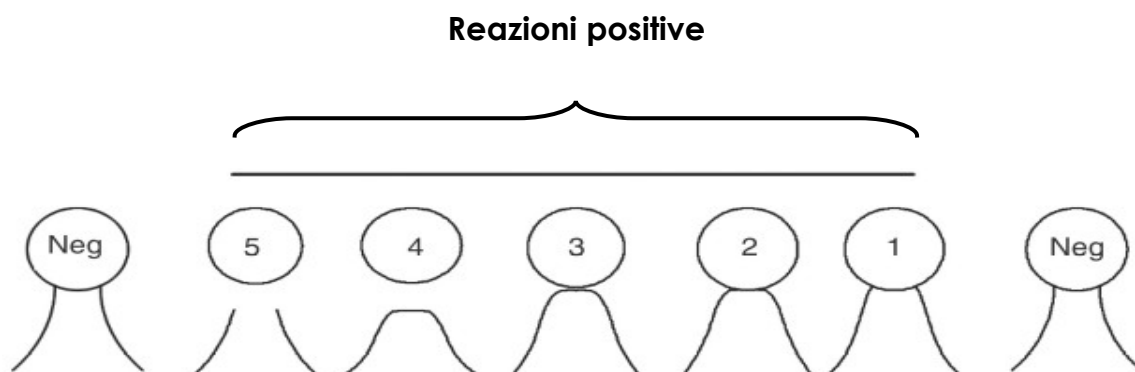
I risultati saranno messi a disposizione del Ministero della Salute e, se richiesto, ad enti terzi autorizzati, previa informazione per iscritto ai partecipanti al circuito.

## Composizione e distribuzione del pannello di sieri

Il pannello di sieri scelti per il CI è stato allestito a partire da 5 sieri equini, positivi e negativi, disponibili presso il CRAIE. I sieri positivi vengono preventivamente saggiati ed eventualmente diluiti in siero negativo per ottenere diversi livelli di reattività.

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 singoli laboratori partecipanti.

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



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

Ciascuno dei 5 sieri positivi è stato distribuito in doppia aliquota ai fini della valutazione della ripetibilità dell'assegnazione dello score, mentre il siero negativo è stato distribuito in 4 repliche.

---

## **Controlli di qualità**

### *Test di omogeneità*

Per il test di omogeneità sono stati esaminati in AGID un numero sufficiente di campioni al fine di rilevare il 1% di campioni non omogenei con il 95% di IC ([http://www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)).

### *Test di stabilità*

Il test di stabilità viene eseguito per valutare effetto di temperatura e tempo:

- un pannello è esaminato a tempo 0
- 1 pannello è conservato a  $(-20\pm 5)^{\circ}\text{C}$  (temperatura prevista per la conservazione della matrice interessata): le prove sono eseguite dopo 15 gg;
- 1 pannello è conservato a  $(+37\pm 1)^{\circ}\text{C}$  sottoponendolo a prova a 15 gg.

I pannelli esaminati hanno dato esiti attesi nelle prove di omogeneità e stabilità.

## **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.

## **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 , restituito entro la data di scadenza all'indirizzo e-mail: [centroreferenzaaie@izslt.it](mailto:centroreferenzaaie@izslt.it).

---

## Valutazione dei risultati

Per l'analisi statistica è stata valutata la concordanza mediante il calcolo del K di Cohen pesato<sup>4</sup> e del K multiplo<sup>5</sup>. 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 1.

PESI STATISTICA K		ESITO ATTESO	
		NEGATIVO	POSITIVO
ESITO LABORATORIO	NEGATIVO	1	-2
	POSITIVO	0,8	1

Tabella 1: Pesi attribuiti agli esiti per il calcolo del K di Cohen pesato

I laboratori potranno valutare la propria attività secondo la griglia di valutazione proposta da J. Richard Landis e Gary G. Koch<sup>6</sup>, riportata in tabella 2.

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

Tabella 2: Griglia di valutazione del K di Cohen

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

K < 0,9 Insoddisfacente;

K ≥ 0,9 Soddisfacente.

## RISULTATI

Il pannello di sieri è stato distribuito a 12 laboratori. Nella tabella 3 viene riportata la decodifica dei sieri distribuiti.

LAB N°	N° SIERO ORIGINALE	S1	S1	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5
	ESITO ATTESO AGID	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO/NEGATIVO	POSITIVO/NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
	SCORE ATTESO CODICE LAB	0	0	0	0	3	3	2	2	0-1	0-1	1	1
1	E	E5	E3	E7	E9	E1	E6	E2	E4	E11	E12	E8	E10
5	G	G2	G1	G12	G3	G9	G7	G8	G6	G4	G10	G5	G11
10	F	F8	F11	F1	F9	F7	F4	F10	F12	F6	F3	F2	F5
18	N	N2	N9	N6	N1	N5	N7	N4	N8	N10	N12	N3	N11
26	C	C8	C1	C4	C5	C10	C6	C2	C9	C11	C3	C7	C12
33	M	M1	M8	M12	M4	M2	M9	M10	M7	M11	M3	M6	M5
49	H	H5	H4	H11	H1	H8	H9	H10	H7	H2	H12	H3	H6
53	Q	Q8	Q2	Q11	Q10	Q6	Q5	Q4	Q12	Q3	Q1	Q9	Q7
58	D	D11	D7	D1	D12	D10	D6	D4	D9	D3	D5	D2	D8
55	J	J9	J4	J6	J10	J5	J7	J12	J8	J1	J3	J11	J9
62	Y	Y9	Y7	Y12	Y1	Y11	Y10	Y8	Y3	Y2	Y6	Y4	Y5
64	K	K5	K11	K7	K1	K4	K10	K6	K2	K3	K8	K9	K12

Tabella 3: Codifica dei campioni distribuiti ai laboratori partecipanti.

### K di Cohen e K multiplo

In tabella 4 sono riportati i valori di K di Cohen pesato ottenuti dai laboratori partecipanti. ed il valore di K multiplo.

LAB N°	CODICE	K COHEN
1	A	1
5	G	1
10	F	1
18	N	1
26	C	1
33	M	1
49	H	1
53	Q	1
55	J	1
58	D	1
62	Y	1
64	K	1
	<b>K MULTIPLO</b>	<b>1</b>

Tabella 4: Valori di K di Cohen per ciascun laboratorio partecipante, e valore di K multiplo complessivo del sistema diagnostico nazionale. Il limite di accettabilità fissato è 0,9.



## Valutazione della reattività del siero (Risultato qualitativo e Score)

La concordanza qualitativa non è stata calcolata in quanto tutti i laboratori hanno dato risultati pienamente concordi per tutti i sieri esaminati. Per quanto riguarda lo score, nelle figure da 2 a 5 sono mostrati gli score assegnati da ciascun laboratorio rispettivamente ai sieri da 2 a 5.

Figura 2: Score assegnati da ciascun laboratorio alle due repliche del siero 2, con score atteso 3

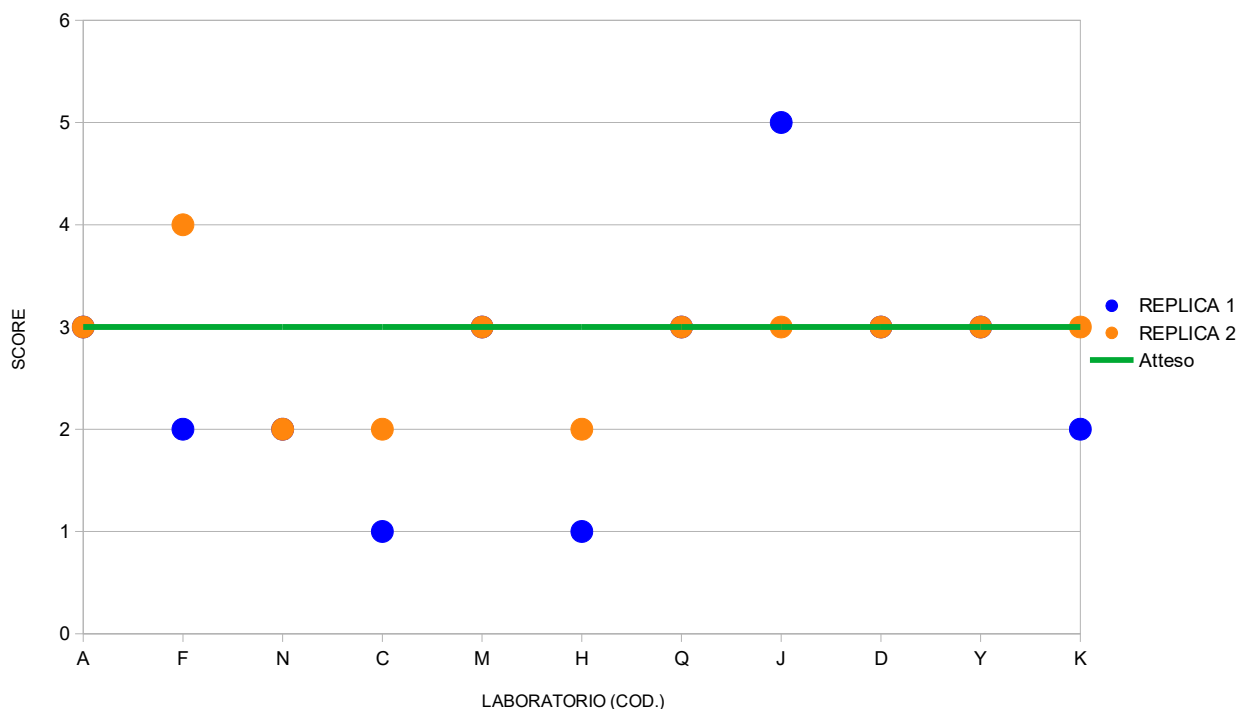


Figura 3: Score assegnati da ciascun laboratorio alle due repliche del siero 3, con score atteso 2

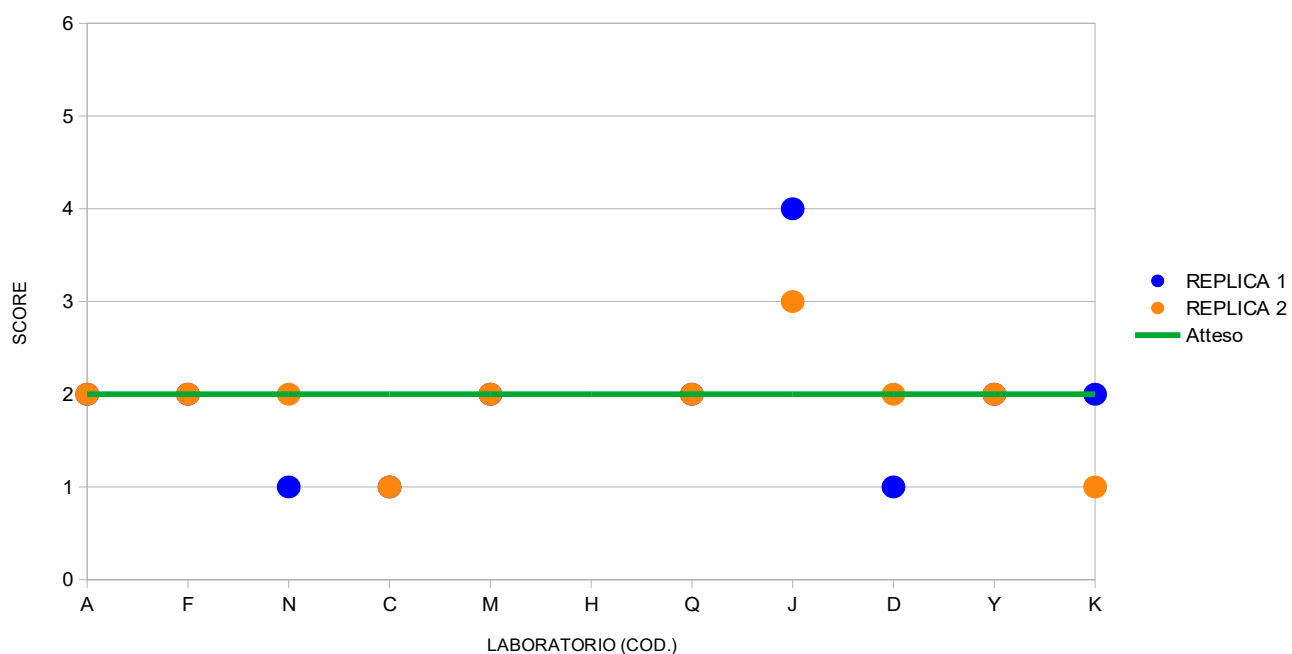


Figura 4: Score assegnati da ciascun laboratorio alle due repliche del siero 4, con score atteso 0/1

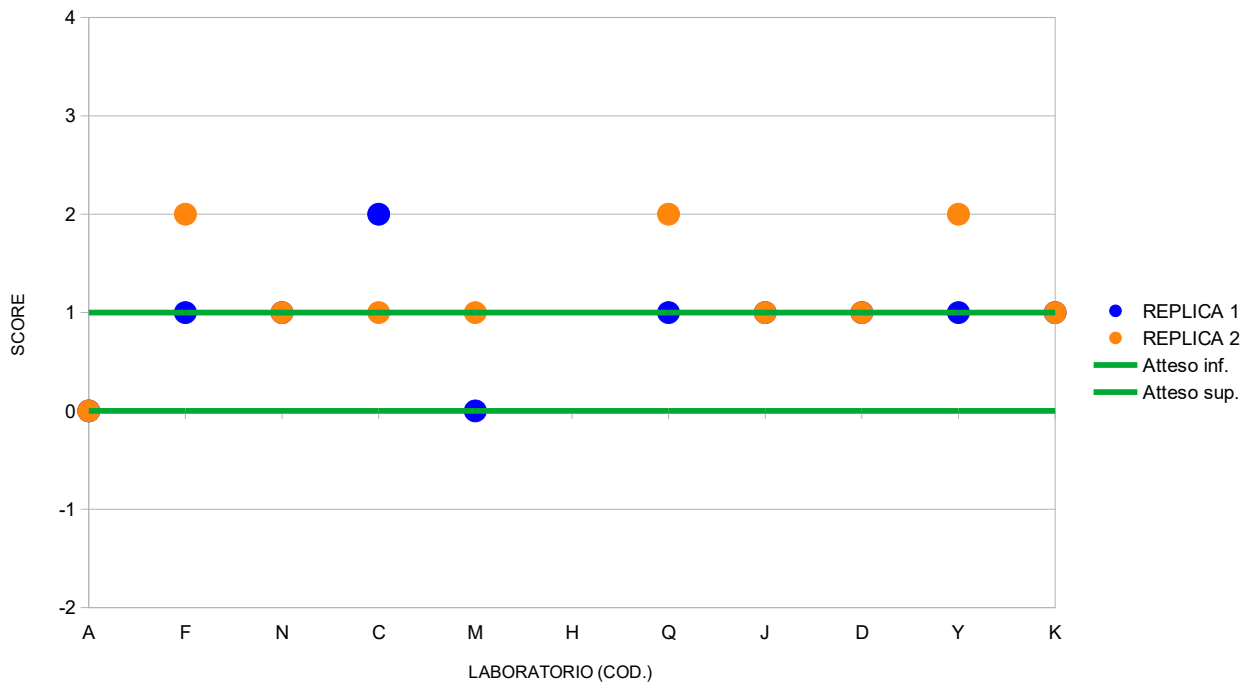
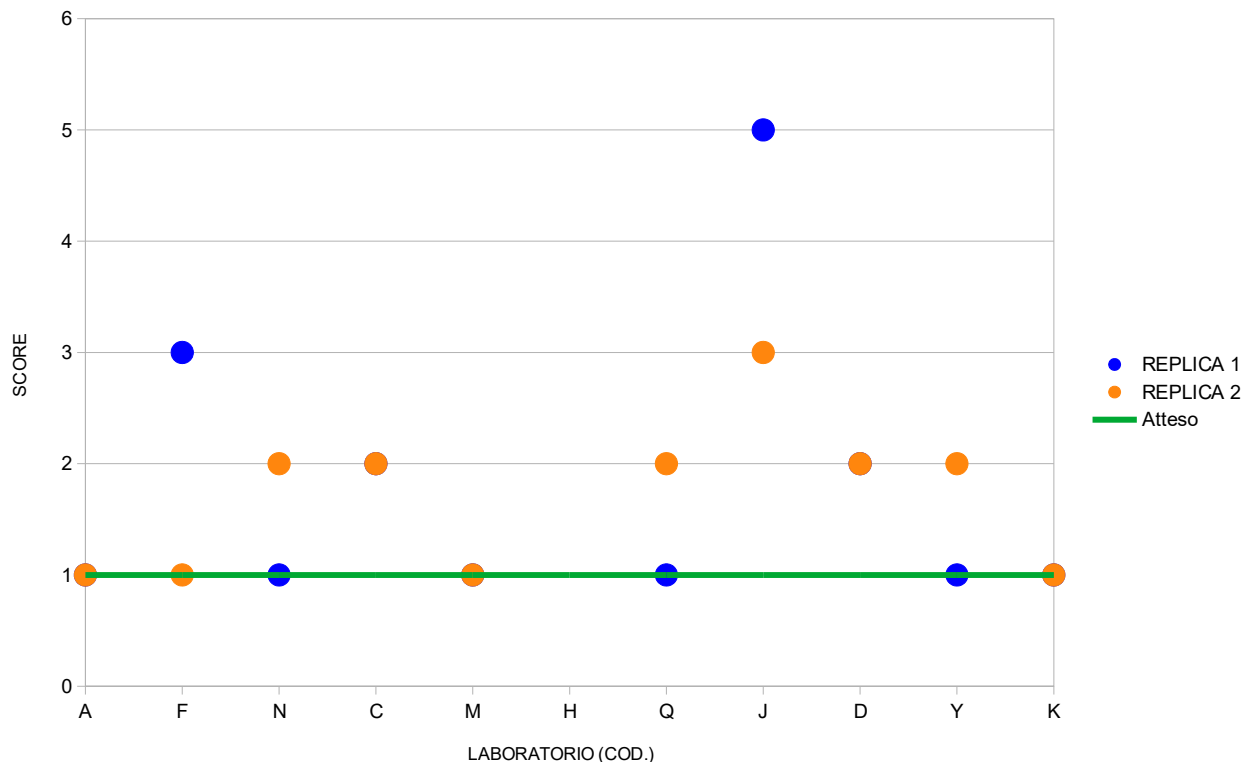


Figura 5: Score assegnati da ciascun laboratorio alle due repliche del siero 5, con score atteso 1



---

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

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.

La valutazione della concordanza è stata effettuata con il K pesato allo scopo di valutare in maniere diversa un difetto di sensibilità rispetto ad un difetto di specificità.

Al circuito hanno aderito 12 laboratori. Tra il momento dell'invio dei risultati e la stesura del report un laboratorio ha ritirato la prova e di conseguenza non è stato considerato nel report. Tra gli undici rimanenti, otto laboratori hanno ottenuto subito una performance soddisfacente mentre tre laboratori hanno necessitato l'invio di un nuovo pannello, per il quale hanno ottenuto un esito soddisfacente.

La non omogeneità dei risultati riportati in termini di score conferma nuovamente 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. È da far notare inoltre che lo score 5 è uno score di positività e non di negatività, come invece è stato riportato da un laboratorio, nonostante la corretta classificazione qualitativa.

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"<sup>7</sup>.

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 media e debole risulta fondamentale

---

associare l'ELISA all'AGID per colmarne il difetto di sensibilità anche per i controlli delle movimentazioni.

### **AZIONI CORRETTIVE**

Il Centro di Referenza si rende disponibile a effettuare addestramento del personale per l'esecuzione della prova qualora venisse richiesta dai laboratori partecipanti.

### **RIFERIMENTI 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 3.5, Chapter 3.5.6 <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/accessonline/>;
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. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33: 159–74;
7. 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.