



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 ELISA

REPORT

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

GRUPPO DI LAVORO:

Alessia Altigeri
Elisa Cammalleri
Roberta Giordani
Roberto Nardini
Ida Ricci
Francesca Rosone
Samanta Sabatini
Massimiliano Simula
Donatella Stilli

Indice generale

INTRODUZIONE.....	4
SCOPO DEL CIRCUITO.....	4
DESCRIZIONE DEL CIRCUITO.....	4
Adesione.....	4
Identificazione dei Laboratori partecipanti.....	4
Riservatezza.....	5
Composizione e distribuzione del pannello di sieri.....	5
Controlli di qualità.....	5
Test di omogeneità.....	5
Test di stabilità.....	6
Invio e conservazione dei pannelli.....	6
Espressione dei risultati.....	6
Valutazione dei risultati.....	7
RISULTATI.....	8
K di Cohen e K multiplo.....	8
Valutazione della reattività del siero (Risultato qualitativo e Score).....	10
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	12
AZIONI CORRETTIVE.....	13
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	13

INTRODUZIONE

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.

SCOPO DEL CIRCUITO

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.

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 5 sieri equini, positivi e negativi, disponibili presso il CRAIE. I sieri positivi vengono saggiate preventivamente ed eventualmente diluiti in siero negativo per ottenere diversi livelli di reattività. Ciascun siero positivo è stato distribuito in due repliche ed il siero negativo in sei repliche, come da tabella 1, ai fini della valutazione della precisione.

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.

Tabella 1: Composizione del pannello di sieri utilizzati nel circuito

NUMERO SIERO	TIPOLOGIA	REATTIVITÀ ATTESA
1	SIERO NEGATIVO	NEGATIVO
2	SIERO POSITIVO DILUITO 1:64	POSITIVO
3	SIERO POSITIVO DILUITO 1:128	POSITIVO
4	SIERO POSITIVO DILUITO 1:256	POSITIVO
5	SIERO POSITIVO DILUITO 1:512	DUBBIO/POSITIVO

Controlli di qualità

Test di omogeneità

Per il test di omogeneità sono stati esaminati in ELISA 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).

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 ELISA con i lotti dei kit approvati 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 INVIO RISULTATI CI AIE 2020 ELISA”, in formato pdf per gli esiti qualitativi e in formato Excel per l’inserimento della densità ottica (DO) e restituito entro la data di scadenza all’indirizzo e-mail: centroreferenzaaie@izslt.it.

Valutazione dei risultati

Per l'analisi statistica è stata valutata la concordanza mediante il calcolo del K di Cohen pesato² e del K multiplo³. 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 riportato nella tabella 2.

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

PESI STATISTICA K		ESITO ATTESO		
		NEGATIVO	DUBBIO	POSITIVO
ESITO LABORATORIO	NEGATIVO	1,00	-2,00	-3,00
	DUBBIO	0,80	1,00	0,10
	POSITIVO	0,80	1,00	1,00

I laboratori potranno valutare la propria attività secondo la griglia di valutazione proposta da J. Richard Landis e Gary G. Koch⁴, riportata in tabella 3.

Tabella 3: Griglia di valutazione del K di Cohen

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

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

K < 0,9 Insoddisfacente;

K ≥ 0,9 Soddisfacente.

RISULTATI

Il pannello è stato distribuito a 45 laboratori. Di questi 10 hanno utilizzato il kit CTB AIE IZSLT, 9 il kit Eradikit[®] EIAV, 4 il kit prodotto dall'IZS LER, 7 il kit Equine Infectious Anemia Virus ELISA v2 e 15 il kit ID Screen[®] Equine Infectious Anemia Double Antigen. Nella tabella 4 viene riportata la decodifica dei sieri distribuiti. Nove laboratori non hanno ottenuto un valore di K di Cohen soddisfacente. Il K multiplo risulta 0,87 (non soddisfacente).

K di Cohen e K multiplo

In tabella 5 sono riportati i valori di K di Cohen pesato ottenuti dai laboratori partecipanti. ed il valore di K multiplo.

Tabella 5: 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. In azzurro i *valori inferiori*.

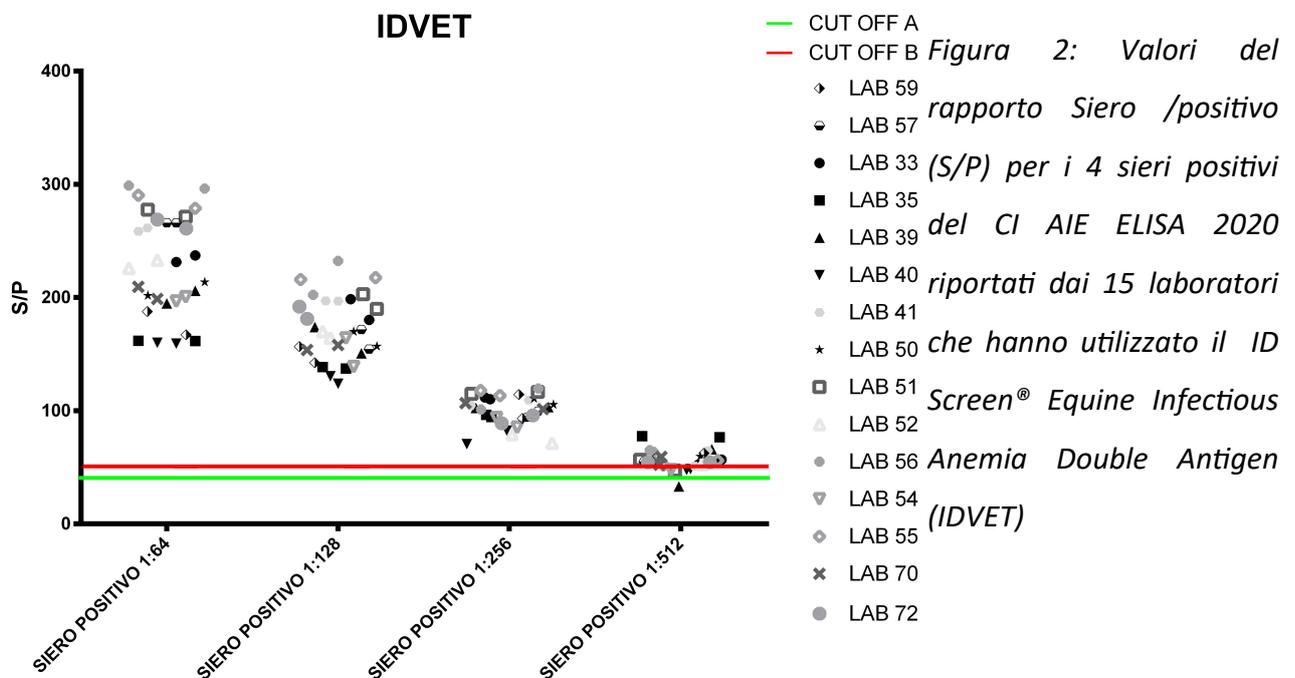
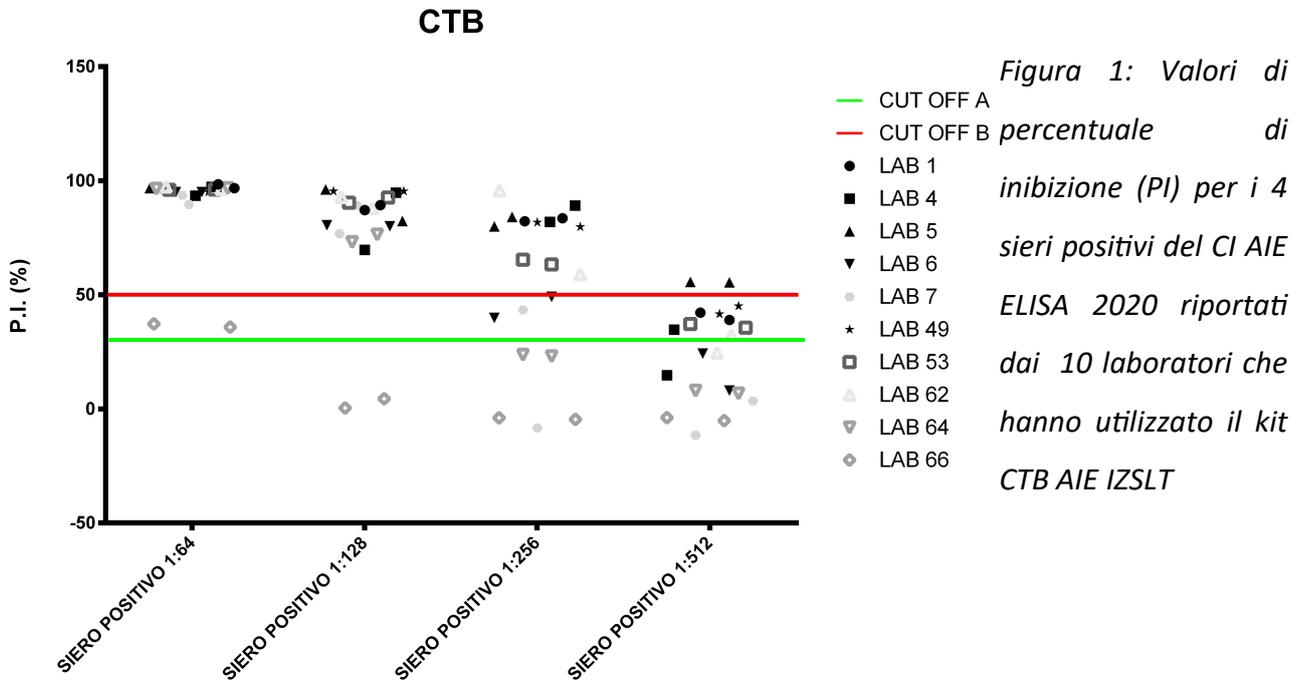
NUMERO LAB	CODICE LAB	K COHEN	NUMERO LAB	CODICE LAB	K COHEN	K MULTIPOLO
1	A	1,00	48	Z	1,00	0,87
4	B	0,77	49	AA	1,00	
5	C	1,00	50	AB	1,00	
6	D	0,46	51	AC	0,77	
7	AU	0,28	52	AD	1,00	
10	F	1,00	53	AE	1,00	
11	G	1,00	54	AF	1,00	
17	J	1,00	55	AG	1,00	
18	K	1,00	56	AH	1,00	
20	L	0,56	57	AS	1,00	
23	M	1,00	58	AI	1,00	
26	N	1,00	59	AJ	1,00	
33	O	1,00	60	AK	1,00	
35	P	1,00	61	AL	1,00	
39	Q	1,00	62	AM	0,77	
40	R	0,56	64	AN	0,36	
41	S	1,00	66	BC	-0,35	
42	T	1,00	68	AO	1,00	
43	U	1,00	69	AP	1,00	
44	V	1,00	69	AT	1,00	
45	W	1,00	70	AQ	1,00	
46	X	1,00	71	AR	1,00	
47	Y	1,00	72	AX	1,00	

Tabella 4: Codifica dei campioni distribuiti ai laboratori partecipanti.

NUMERO LAB	NUMERO SIERO	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
NUMERO LAB	CODICE LAB	SIERO NEGATIVO	SIERO POSITIVO 1:64	SIERO POSITIVO 1:64	SIERO POSITIVO 1:128	SIERO POSITIVO 1:128	SIERO POSITIVO 1:256	SIERO POSITIVO 1:256	SIERO POSITIVO 1:512	SIERO POSITIVO 1:512					
1	A	A9	A6	A2	A1	A13	A12	A4	A10	A3	A5	A8	A7	A14	A11
4	B	B26	B30	B25	B19	B18	B28	B22	B29	B17	B20	B21	B23	B16	B24
5	C	C44	C45	C31	C34	C36	C35	C43	C33	C41	C39	C32	C37	C42	C40
6	D	D60	D52	D48	D50	D59	D53	D47	D46	D56	D55	D49	D58	D51	D54
7	AU	AU697	AU695	AU691	AU698	AU700	AU696	AU702	AU693	AU705	AU699	AU701	AU692	AU703	AU694
10	F	F68	F73	F64	F69	F62	F71	F65	F67	F75	F74	F66	F70	F72	F63
11	G	G77	G79	G85	G86	G76	G87	G81	G89	G84	G82	G88	G90	G83	G78
17	J	J96	J98	J95	J100	J99	J105	J94	J103	J93	J104	J92	J101	J91	J97
18	K	K106	K108	K118	K114	K120	K111	K115	K119	K109	K110	K107	K112	K117	K113
20	L	L127	L133	L121	L125	L134	L132	L131	L126	L123	L135	L128	L129	L124	L122
23	M	M145	M141	M136	M144	M149	M137	M140	M142	M150	M148	M139	M138	M143	M146
26	N	N159	N165	N155	N163	N157	N160	N162	N164	N151	N154	N158	N152	N156	N153
33	O	O171	O175	O173	O180	O178	O174	O172	O179	O168	O166	O170	O167	O176	O177
35	P	P193	P185	P192	P184	P188	P190	P191	P195	P187	P194	P181	P189	P182	P186
39	Q	Q208	Q205	Q207	Q209	Q198	Q206	Q197	Q200	Q202	Q204	Q199	Q196	Q210	Q201
40	R	R219	R215	R212	R216	R220	R217	R214	R218	R224	R223	R213	R211	R225	R221
41	S	S226	S239	S229	S235	S234	S227	S237	S236	S228	S231	S232	S233	S240	S238
42	T	T243	T242	T250	T252	T241	T253	T247	T245	T255	T249	T251	T246	T254	T244
43	U	U270	U260	U263	U269	U265	U264	U266	U270	U256	U268	U267	U262	U258	U259
44	V	V282	V281	V271	V285	V283	V279	V275	V280	V273	V276	V272	V274	V277	V284
45	W	W298	W296	W292	W290	W287	W293	W288	W286	W300	W295	W289	W299	W291	W294
46	X	X306	X302	X313	X314	X312	X310	X301	X307	X315	X304	X309	X305	X308	X311
47	Y	Y317	Y320	Y321	Y328	Y323	Y330	Y316	Y327	Y325	Y326	Y324	Y319	Y318	Y322
48	Z	Z343	Z333	Z341	Z331	Z342	Z334	Z338	Z340	Z336	Z345	Z324	Z344	Z337	Z339
49	AA	AA353	AA350	AA346	AA356	AA357	AA352	AA355	AA360	AA354	AA347	AA349	AA358	AA359	AA348
50	AB	AB362	AB363	AB364	AB375	AB374	AB369	AB368	AB361	AB370	AB367	AB373	AB372	AB365	AB371
51	AC	AC388	AC385	AC379	AC381	AC386	AC390	AC378	AC387	AC383	AC389	AC380	AC376	AC382	AC377
52	AD	AD405	AD395	AD402	AD391	AD403	AD397	AD399	AD396	AD394	AD404	AD398	AD392	AD401	AD393
53	AE	AE423	AE430	AE422	AE433	AE421	AE431	AE432	AE426	AE429	AE434	AE425	AE427	AE424	AE435
54	AF	AF441	AF448	AF449	AF444	AF439	AF438	AF443	AF442	AF436	AF450	AF447	AF437	AF445	AF440
55	AG	AG464	AG457	AG465	AG456	AG458	AG455	AG461	AG454	AG463	AG451	AG459	AG453	AG452	AG460
56	AH	AH467	AH478	AH475	AH470	AH480	AH468	AH473	AH476	AH474	AH471	AH479	AH477	AH469	AH472
57	AS	AS491	AS489	AS488	AS490	AS482	AS494	AS492	AS484	AS495	AS485	AS486	AS481	AS483	AS487
58	AI	AI510	AI508	AI500	AI498	AI509	AI499	AI503	AI497	AI496	AI502	AI505	AI506	AI504	AI501
59	AJ	AJ515	AJ523	AJ517	AJ516	AJ518	AJ512	AJ511	AJ520	AJ519	AJ514	AJ522	AJ521	AJ525	AJ513
60	AK	AK528	AK536	AK535	AK538	AK526	AK527	AK530	AK539	AK537	AK533	AK540	AK529	AK534	AK531
61	AL	AL549	AL545	AL548	AL543	AL555	AL546	AL550	AL552	AL554	AL551	AL541	AL547	AL553	AL542
62	AM	AM556	AM561	AM569	AM562	AM557	AM566	AM560	AM558	AM567	AM565	AM568	AM570	AM559	AM563
64	AN	AN578	AN574	AN576	AN580	AN582	AN575	AN579	AN585	AN573	AN572	AN584	AN571	AN581	AN577
66	BC	BC821	BC823	BC817	BC815	BC822	BC816	BC814	BC825	BC820	BC811	BC824	BC813	BC812	BC819
68	AO	AO590	AO598	AO593	AO596	AO600	AO595	AO587	AO599	AO586	AO589	AO592	AO594	AO591	AO588
69	AP	AP601	AP607	AP615	AP611	AP602	AP614	AP610	AP606	AP605	AP603	AP608	AP612	AP604	AP609
69	AT	AT687	AT690	AT676	AT684	AT678	AT680	AT679	AT686	AT689	AT677	AT685	AT681	AT683	AT682
70	AQ	AQ413	AQ408	AQ417	AQ411	AQ419	AQ420	AQ415	AQ407	AQ410	AQ412	AQ409	AQ406	AQ418	AQ416
71	AR	AR617	AR628	AR621	AR626	AR629	AR624	AR625	AR630	AR624	AR619	AR620	AR622	AR623	AR616
72	AX	AX746	AX742	AX745	AX736	AX748	AX744	AX738	AX747	AX741	AX739	AX740	AX737	AX743	AX749

Valutazione della reattività del siero (Risultato qualitativo e Score)

Nelle Figure da 1 a 5 i valori di reattività di ciascun siero, espressi in S/P (rapporto siero/positivo) o PI (percentuale di inibizione), in funzione del kit utilizzato dai diversi laboratori.



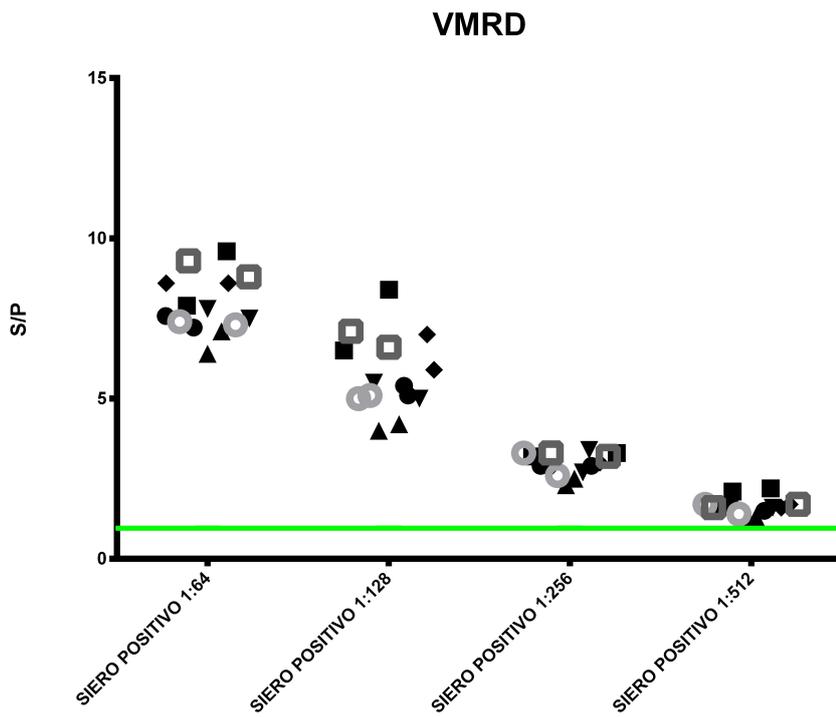


Figura 3: Valori del rapporto Siero /positivo (S/P) per i 4 sieri positivi del CI AIE ELISA 2020 riportati dai 7 laboratori che hanno utilizzato il kit 7 il kit Equine Infectious Anemia Virus ELISA v2 (VMRD)

- CUT OFF
- LAB 42
- LAB 43
- ▲ LAB 44
- ▼ LAB 45
- ◆ LAB 46
- LAB 47
- LAB 48

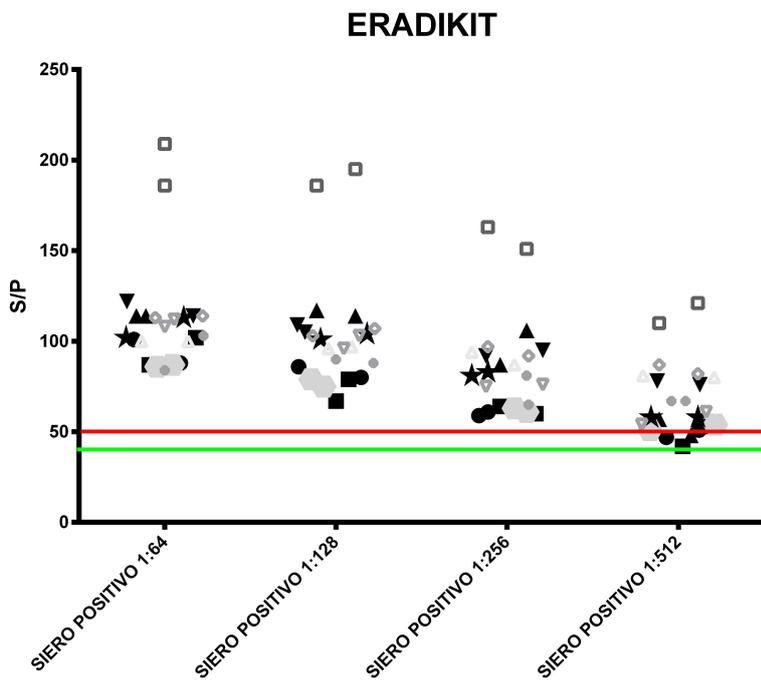
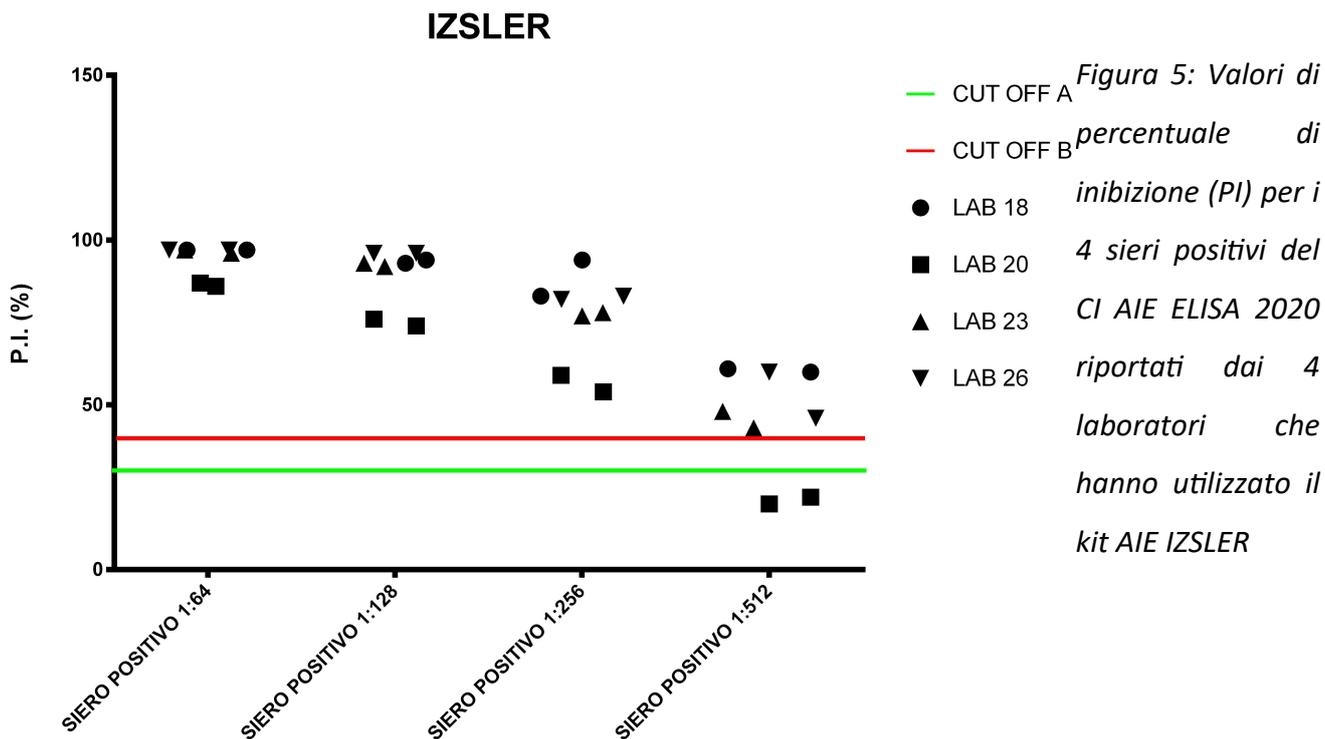


Figura 4: Valori del rapporto Siero /positivo (S/P) per i 4 sieri positivi del CI AIE ELISA 2020 riportati dai 9 laboratori che hanno utilizzato il kit Eradikit® EIAV

- CUT OFF A
- CUT OFF B
- LAB 10
- LAB 11
- ▲ LAB 17
- ▼ LAB 58
- ◐ LAB 60
- ★ LAB 61
- LAB 68
- △ LAB 69 AP
- LAB 69 AT
- ▽ LAB 71 5UL
- ◇ LAB 71 25UL



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 assegnare un peso maggiore ad un difetto di sensibilità rispetto ad un difetto di specificità.

Al circuito hanno aderito 45 laboratori. Nove laboratori non hanno ottenuto una performance soddisfacente e richiedono l'analisi di un nuovo pannello.

Tenuto conto che la piena attuazione della sorveglianza dell'AIE è in corso da più di 5 anni con 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"⁵.

Nella maggioranza dei casi le non conformità si sono evidenziate o per il siero debolmente positivo o per laboratori che hanno iniziato da poco la diagnosi sierologica di AIE.

Si raccomanda la massima attenzione nell'esecuzione della prova, nell'interpretazione dei risultati ottenuti, non solo per i campioni ma anche per i controlli interni della prova e nell'inserimento dei risultati.

AZIONI CORRETTIVE

Il Centro di Referenza si rende disponibile ad inviare un nuovo pannello di sieri ed ad effettuare l'addestramento del personale per l'esecuzione della prova qualora venisse richiesta dai laboratori partecipanti.

Redatto

Roberto Nardini

Verificato e approvato

Il Responsabile del CRAIE

Maria Teresa Scicluna

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. Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull.* 1968; 70: 213–20;
3. Fleiss JL. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychological Bull.* 1971; 76: 378–82;
4. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159–74;
5. 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.