



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA
(D.L.vo 30.06.1993 n. 270)

CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE MALATTIE DEGLI EQUINI
CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER L'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUIDI
SEDE CENTRALE Via Appia Nuova, 1411 – 00178 Roma/Capannelle
Tel. (06) 79099.1 (centralino) – Fax (06) 79340724 <http://www.izslt.it> - E-mail:
webmaster@izslt.it



**VALIDAZIONE DI UN KIT ELISA INDIRECTO 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

**REDATTO DA: GIAN LUCA AUTORINO, ROBERTO NARDINI, MARIA TERESA
SCICLUNA**

INDICE

INTRODUZIONE	3
VALIDAZIONE	7
1.1 Idoneità allo scopo	8
1.2 Idoneità all'utilizzo	8
2. Ottimizzazione e standardizzazione	9
3. Caratteristiche di performance analitica	9
3.1 Specificità analitica	9
3.2 Sensibilità analitica	11
4. Caratteristiche di performance diagnostiche	16
4.1 Sensibilità e specificità diagnostica, valore predittivo positivo e negativo	16
5. Ripetibilità	18
6. Riproducibilità	19
CONCLUSIONI	21
BIBLIOGRAFIA	22
ALLEGATO	24

INTRODUZIONE

L'Anemia Infettiva Equina (AIE) è un'infezione ad eziologia virale degli equidi, sostenuta da un virus della famiglia Retroviridae, genere Lentivirus. La trasmissione del virus dell'AIE avviene di solito attraverso veicoli biologici e meccanici.

I veicoli biologici sono riconosciuti in varie specie di insetti ematofagi, appartenenti alle famiglie Tabanidae, Hippoboscidae e Muscinae; comunemente conosciuti rispettivamente come tafani, mosche cavalline e mosche domestiche [1;2].

I veicoli meccanici principali sono gli interventi terapeutici/chirurgici effettuati senza rispettare le norme di biosicurezza.

Dal 2006, l'Italia attua un piano nazionale di sorveglianza per AIE [3;4;5] che prevede un controllo sierologico di tutta la popolazione equina, ad eccezione degli animali allevati esclusivamente per la produzione di alimenti. I soggetti confermati positivi devono essere isolati rispettando norme di biosicurezza volte ad evitare la trasmissione dell'infezione.

La diagnosi sierologica di questa infezione, secondo il D.M. 4/12/1976, deve essere effettuata dagli IZZSS competenti territorialmente e confermata dal Centro di Referenza Nazionale. Il test di conferma è l'immunodiffusione in gel di Agar (AGID), come descritto da Coggins e dal Manuale OIE [6;7].

Questa tecnica è di semplice esecuzione ma ha un limite di rilevabilità ridotto: campioni con bassi titoli anticorpali possono non presentare linee di precipitazione o formare linee di difficile interpretazione. Infatti, nei casi di debole positività, la soggettività di interpretazione dell'operatore, come anche l'eccesso di antigene utilizzato nella prova, possono influire in maniera determinante sull'esito. Il suo limite di rilevabilità ha reso opportuno lo sviluppo di nuovi protocolli diagnostici, di semplice esecuzione e che presentassero una maggiore sensibilità. Il Manuale OIE contempla la tecnica ELISA come metodo di diagnosi sierologica alternativo, l'Immunoblotting (IB) come metodo di conferma alternativo e metodi diagnostici di biologia molecolare (PCR) in caso di risultati discordanti tra i metodi sierologici [8]. L'IB, per le sue caratteristiche di esecuzione, e la PCR, anche per le caratteristiche di variabilità genetica e della viremia nell'infezione da AIEV, non sono adottabili come test di screening.

Il kit oggetto di validazione è costituito da piastre sensibilizzate con antigeni ricombinanti gag ed env di EIAV.

La procedura prevede:

- Dispensazione di 95 µl di tampone di diluizione dei sieri
- Dispensazione di 5 µl di controlli e di sieri in esame
- Incubazione per 60 minuti a 37°C
- 3 cicli di lavaggio con soluzione di lavaggio
- Dispensazione di 100 µl di coniugato (anticorpo anti IgG di cavallo coniugato con perossidasi)
- Incubazione per 60 minuti a 37°C
- 3 cicli di lavaggio con soluzione di lavaggio
- Dispensazione di 100 µl di substrato
- Incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti
- Dispensazione di 100 µl di soluzione di stop
- Lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 405 nm

I criteri di validazione sono i seguenti:

- La densità ottica (DO) del controllo positivo deve essere >0,4
- Il rapporto tra DO del controllo positivo e negativo deve essere >3

Per l'interpretazione dei risultati si deve calcolare per ogni siero la percentuale di reattività secondo la formula:

$$R = \frac{DO_{\text{Campione}} - DO_{\text{Controllo Negativo}}}{DO_{\text{Controllo Positivo}} - DO_{\text{Controllo Negativo}}} \times 100$$

Sieri con reattività $\geq 50\%$ sono considerati positivi

Sieri con reattività $\leq 40\%$ sono considerati negativi

Sieri con reattività compresa fra 40% e 50% sono considerati dubbi

Questa validazione è stata condotta seguendo i criteri di validazione riportati nel Manuale OIE [9] e riassunti in tabella 1.

Tabella 1: Criteri di validazione secondo OIE

1. Idoneità allo scopo prefissato ed all'utilizzo
2. Ottimizzazione
3. Standardizzazione
4. Sensibilità analitica
5. Specificità analitica
6. Robustezza intralaboratorio
7. Ripetibilità
8. Sensibilità diagnostica
9. Specificità diagnostica
10. Riproducibilità
11. Robustezza interlaboratorio

VALIDAZIONE

1.1 Idoneità allo scopo

Tra gli scopi elencati nel manuale OIE il kit in oggetto ha può essere adatto allo scopo di:

- Accertare la presenza/assenza dell'agente patogeno in animali soggetti a movimentazione;
- Eradicare la malattia da una popolazione definita;
- Stimare la prevalenza.

1.2 Idoneità all'utilizzo

Oltre che da un punto di vista scientifico, la valutazione di un test deve comprendere anche tutti gli aspetti tecnici e pratici che riguardano il suo impiego e che condizionano la sua accettabilità da parte degli utilizzatori. I requisiti considerati sono i seguenti:

Disponibilità delle attrezzature: attualmente la tecnica ELISA è largamente adottata presso tutti i laboratori e gli stessi sono dotati dei materiali di consumo e delle apparecchiature necessarie all'esecuzione.

Livello di preparazione tecnica e facilità di interpretazione: la procedura di esecuzione richiede il medesimo livello di preparazione necessario all'utilizzo di qualsiasi altro kit ELISA. L'interpretazione della prova si basa su 2 criteri di validazione e sull'applicazione di una formula per il calcolo dei valori di soglia e della reattività dei campioni in esame, che risulta di facile sviluppo. Ogni campione è qualificato inequivocabilmente ed in modo oggettivo.

Disponibilità dei reagenti: il kit è già completo di tutti i reagenti necessari per l'esecuzione della prova.

Requisiti di trasporto: il kit necessita di essere mantenuto ad una temperatura di +4°C, requisito attualmente assicurato dalle principali ditte di spedizioni.

Sicurezza e biosicurezza: in condizioni di norme generali di sicurezza tutte le fasi di esecuzione non comportano rischi per l'operatore. I sieri positivi di riferimento potrebbero rappresentare un veicolo di infezione dell'AIEV se inoculati a soggetti suscettibili. Per questo si raccomanda un utilizzo esclusivo ed uno smaltimento a norma di legge.

Tempo di risposta: il tempo necessario per ottenere l'esito di un campione è di circa tre ore, mentre per l'AGID risulta compreso tra 24 e 48h.

Costo per analisi: non è stato possibile valutarlo in quanto non disponibili al momento della validazione.

2. Ottimizzazione e standardizzazione

Queste due fasi sono state effettuate dal DPAEE (documento di validazione interna disponibile su richiesta).

3. Caratteristiche di performance analitica

3.1 Specificità analitica

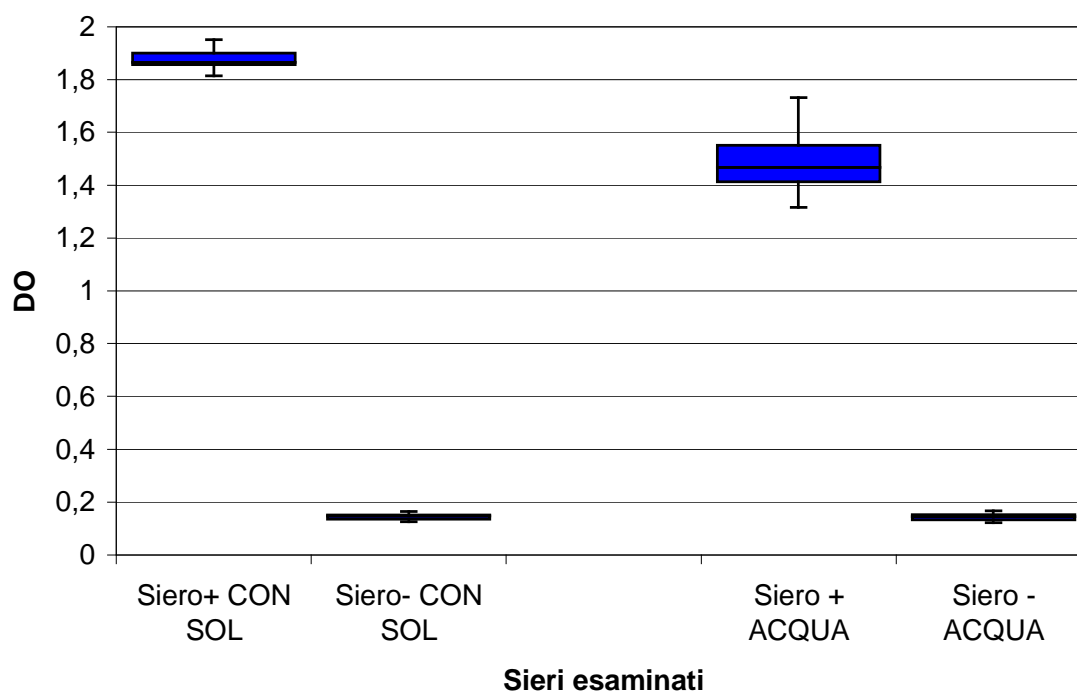
La specificità analitica definisce quanto il test distingue tra l'analita target e altri componenti presenti nella matrice, a tre livelli diversi. Questi tre livelli possono essere espressi dai concetti di selettività, esclusività ed inclusività.

La selettività si riferisce a quanto il metodo può individuare l'analita target, in presenza di interferenze di diversa natura (componenti della matrice, sostanze degradanti, legami aspecifici di reagenti a una fase solida, anticorpi vaccinali).

Inoltre per valutare la selettività è stato effettuato un confronto tra una prova col lavaggio come previsto da procedura e prova con lavaggio con solo acqua ultrapura esaminando 24 sieri positivi e 26 sieri negativi.

Il confronto tra la metodica standard e quella modificata è esemplificato nel grafico 1. È stata rilevata tramite il test di Student una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di sieri positivi ($p < 0.01$); mentre tra i due gruppi di sieri negativi la differenza non è risultata significativa ($p = 0,568$).

Grafico 1: Confronto tra DO di sieri positivi e negativi utilizzando la soluzione di lavaggio e acqua pura



L'utilizzo dell'acqua abbassa il valore di DO di almeno 0,4. Questo potrebbe aumentare la quota di falsi negativi in caso di sieri poco reattivi; e dimostra invece come l'utilizzo della soluzione di lavaggio renda questa ELISA sensibile.

L'esclusività è la capacità del test di rilevare l'analita target e di escludere tutti le altre entità biologiche conosciute che possono risultare cross-reattive.

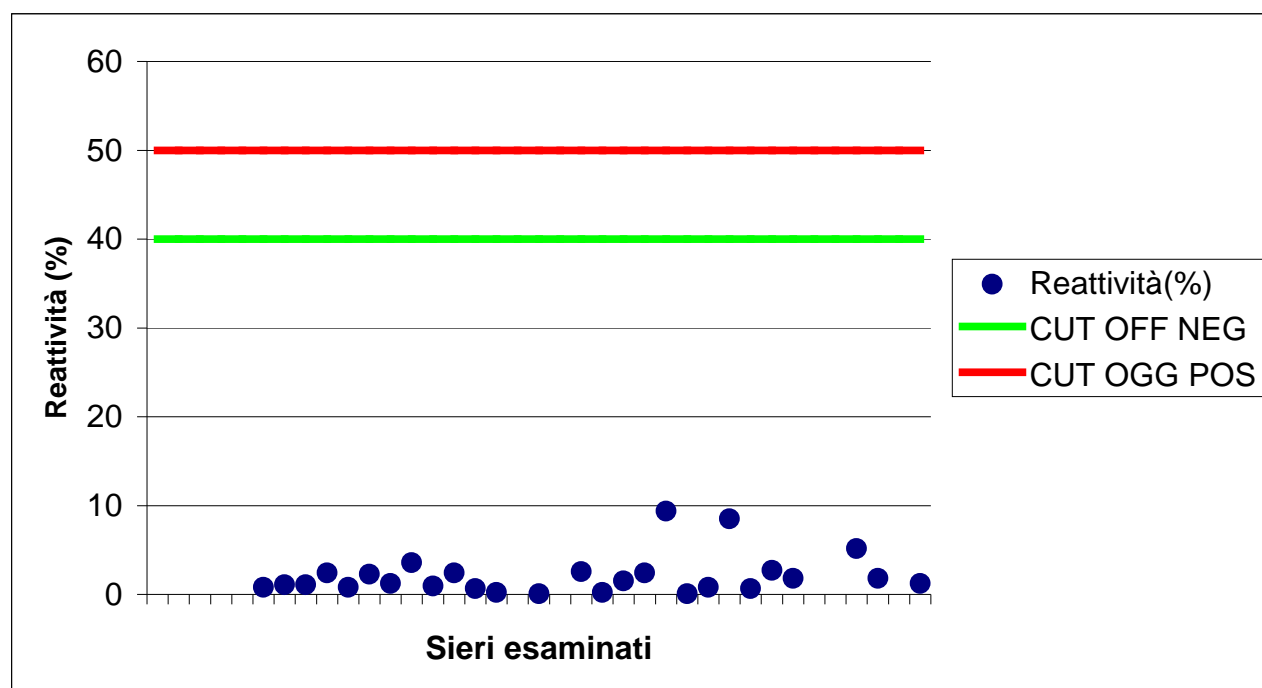
Sebbene il manuale OIE riporti questa caratteristica come essenziale per un test di conferma e non per un test di screening come l'ELISA in questione, si è scelto di valutarne ugualmente l'esclusività.

L'esclusività è stata valutata esaminando 37 sieri positivi per altri Retrovirus: FIV (Virus dell'Immunodeficienza Felina), FeLV (Virus della Leucemia felina), Virus della Visna Maedi. Nel grafico 2 sono mostrate le reattività dei sieri testati, tutti risultati negativi. L'esclusività è stata valutata anche su sieri di cavallo positivi verso le seguenti patologie:

- Equid Herpesvirus 1 e 4
- Equine Viral Arteritis
- Equine Influenza A 1 e 2 (H7N7 e H3N8)

Tutti i sieri sono risultati negativi al test.

Grafico 2: Reattività dei sieri FIV FeLV e Visna Maedi positivi testati con il kit per AIE, in rosso e verde rispettivamente i valori di cut off positivo e negativo.



L'inclusività è la capacità di un test di riconoscere varie sierovarianti della stessa entità biologica. Considerato che l'espressione antigenica della p26 risulta essere fortemente conservata, non è necessaria la valutazione dell'inclusività [10].

3.2 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata stimata calcolando il limite di rilevabilità.

Il manuale OIE definisce il limite di rilevabilità (LOD - limit of detectability) per un test indiretto, come la diluizione del campione precedente a quella in cui l'analita è indistinguibile dalla matrice di controllo. Non essendo possibile, per questo, metodo, la quantificazione diretta dell'analita, in questo caso gli anticorpi contro AIEV, si è proceduto a confrontare il limite di rilevabilità del test ELISA con quello del test di Coggins analizzando diluizioni scalari in base 3 di un siero positivo di riferimento secondario, in siero negativo. Per un'ulteriore valutazione della sensibilità analitica sono stati analizzati 96 sieri di 24 animali sperimentalmente infetti, a vari giorni post-infezione; e 55 sieri di 10 muli naturalmente infetti e immunosoppressi a diversi giorni post-immunosoppressione; anch'essi confrontati con l'AGID e con tutti gli altri kit ELISA disponibili in commercio in Italia. Nel grafico 3 sono mostrati i valori di reattività delle diluizioni scalari del siero positivo di

riferimento secondario. In tabella 2 sono mostrati i risultati qualitativi delle stesse diluizioni analizzate con la tecnica AGID confrontate con l'ELISA.

Grafico 3: Reattività delle diluizioni scalar, (trasformate in LOG₁₀), del siero positivo di riferimento secondari

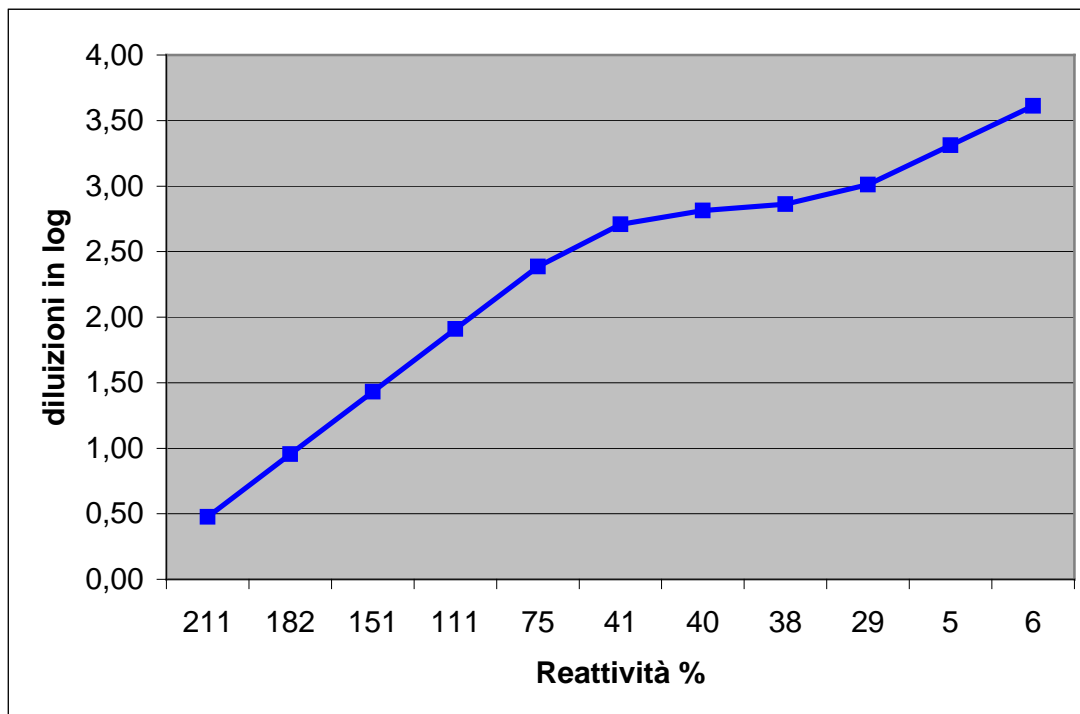
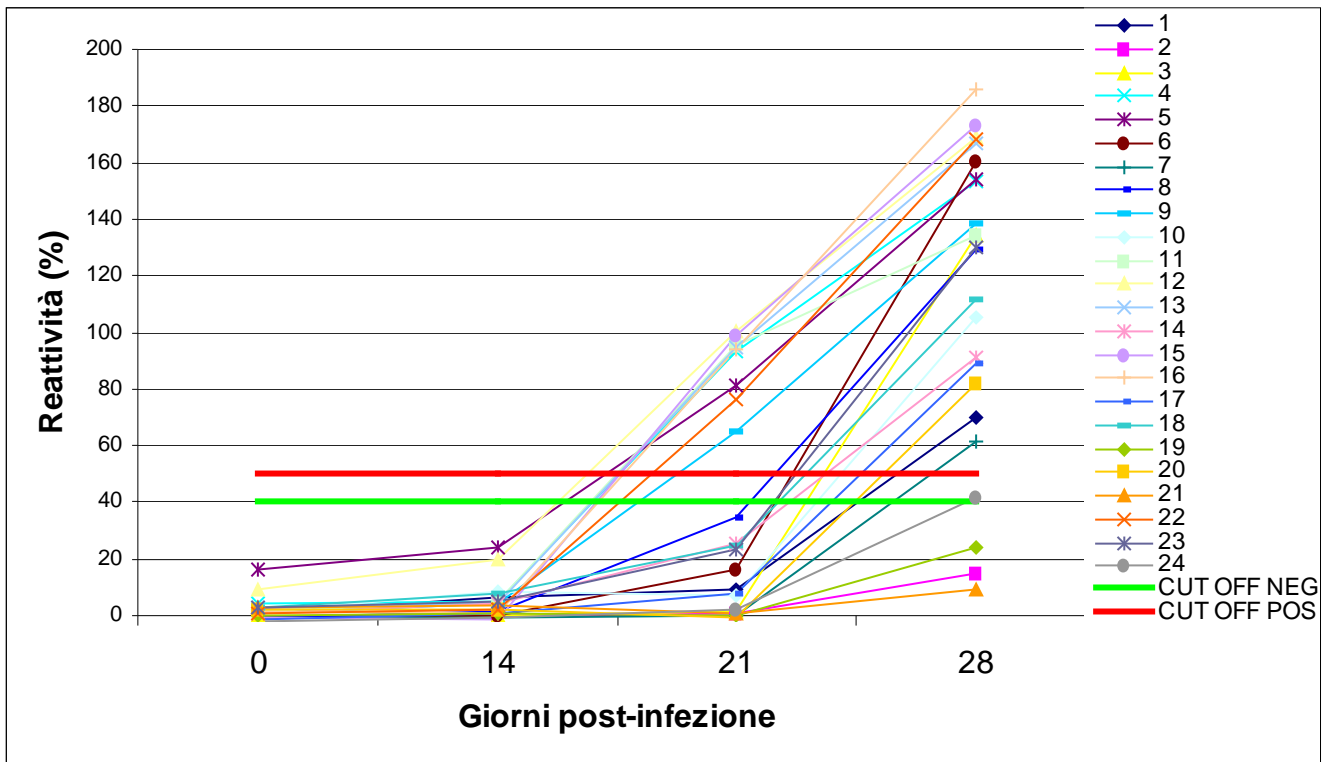


Tabella 2: Confronto tra esiti qualitativi di diluizioni scalari di un siero positivo di riferimento secondario testate in parallelo in ELISA ed AGID

Diluizione	ELISA	AGID
1:3	POSITIVO	POSITIVO
1:9	POSITIVO	POSITIVO
1:27	POSITIVO	NEGATIVO
1:81	POSITIVO	NEGATIVO
1:243	POSITIVO	NEGATIVO
1:512	DUBBIO	NEGATIVO
1:650	DUBBIO	NEGATIVO
1:729	NEGATIVO	NEGATIVO
1:1024	NEGATIVO	NEGATIVO
1:2048	NEGATIVO	NEGATIVO
1:4096	NEGATIVO	NEGATIVO

Nel grafico 4 sono mostrati i valori di reattività dei sieri di animali sperimentalmente infetti . In tabella 3 sono mostrati i risultati qualitativi degli stessi sieri analizzati con la tecnica AGID confrontate con l'ELISA (sono stati analizzati sono il T21 e il T28 PI). Nella tabella 4 sono mostrati i risultati qualitativi dei muli infetti immunosoppressi analizzati con la tecnica AGID confrontati con l'ELISA.

Grafico 4: Reattività di 24 sieri di animali sperimentalmente infetti a vari giorni post infezione (T0, T14, T21, T28) esaminati in ELISA



VALIDAZIONE

Tabella 3: Confronto tra esiti qualitativi di animali sperimentalmente infetti a vari giorni post infezione (T21 e T28) testati con il kit DPAEE (ELISA) e gli altri kit commerciali (KIT 1-5) e con l'AGID. I prelievi a tempo 0 e 14 non sono stati riportati perché risultati negativi con entrambi i test.

Sieri T21	ELISA	KIT 1	KIT 2	KIT 3	KIT 4	KIT 5	AGID	Sieri T28	ELISA	KIT 1	KIT 2	KIT 3	KIT 4	KIT 5	AGID
1	-	-	-	-	-	-	-	1	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	3	+	-	+	+	+	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	-	-	-	-	-	-	5	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	6	+	+	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	-	7	+	+	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	-	-	-	-	-	-	9	+	-	+	+	+	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	10	+	-	-	+	+	-	-
11	+	-	-	-	+	-	-	11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	-	-	-	-	-	-	12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	-	-	-	-	-	13	+	+	+	+	+	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	-	-	-	-	-	-	15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	-	-	-	-	-	-	16	+	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	17	+	-	+	-	Dubbio	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	18	+	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	20	+	-	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	22	+	+	+	+	+	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	23	+	Dubbio	-	+	+	-	+
24	-	-	-	-	-	-	-	24	Dubbio	-	-	-	Dubbio	-	-

Tabella 4: Confronto tra risultati qualitativi dei muli infetti immunosoppressi analizzati in parallelo in ELISA ed AGID

	T2		T7		T14		T21	
	ELISA	AGID	ELISA	AGID	ELISA	AGID	ELISA	AGID
1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
3	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
6	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
7	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
10	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

L'analisi di questi dati dimostra che il kit in esame ha un LOD di 1,4 Log₁₀ inferiore rispetto all'AGID se si considera il risultato positivo; mentre di 1,86 Log₁₀ inferiore se si considera anche il risultato dubbio; il secondo valore ci sembra comunque più corretto considerando che un risultato dubbio in ELISA necessita di ulteriori

approfondimenti per la conferma (rif. Tabella 2). Rispetto all'AGID inoltre, l'ELISA ha mostrato chiaramente una precocità di rilevamento della risposta sierologica in termini temporali, il che le conferisce ottime caratteristiche per l'utilizzo in un piano di sorveglianza.

Il kit si è anche dimostrato più precoce di tutti gli altri kit commerciali disponibili in Italia, identificando ben 9 sieri positivi a T21, al fronte di un solo siero identificato dai kit 1 e 4 e 0 dagli altri.

4 Caratteristiche di performance diagnostiche

4.1 Sensibilità e specificità diagnostica, valore predittivo positivo e negativo

I valori di sensibilità diagnostica (Dse) e specificità diagnostica (Dsp) attesi, utilizzati per il calcolo della Dse e Dsp del test sono rispettivamente 0,99 e 0,80 , stabilendo un valore di intervallo di confidenza (IC) del 99% per la sensibilità e del 95% per la specificità ed una precisione assoluta del 5%. Essendo lo scopo di questo test lo screening della popolazione, i valori di Dse e Dsp attesi, di IC di sono stati scelti avendo come obiettivo quello di ottenere un test con alta sensibilità, prevedendo e valutando come accettabile la conseguente diminuzione della specificità.

La numerosità minima del campione da analizzare per ciascun parametro è stata calcolata utilizzando le formule seguenti (1;2)

$$(1) n = \frac{t^2 * Dse_{attesa} * (1 - Dse_{attesa})}{d^2}$$

$$(2) n = \frac{t^2 * Dsp_{attesa} * (1 - Dsp_{attesa})}{d^2}$$

Dove :

t: valore delle distribuzione t per un livello di confidenza pari al 99%/95%

Dsp_{attesa}: Specificità diagnostica attesa

Dse_{attesa}: Sensibilità diagnostica attesa

d: precisione assoluta desiderata

Per la formula (1) il numero minimo di campioni è 26; per la formula (2) il numero minimo di campioni è 245.

In corso di validazione sono stati testati 31 sieri positivi AGID, 245 sieri negativi AGID estratti dalla routine del laboratorio CERME e 264 sieri negativi AGID forniti dal DPAEE, per un totale di 540 sieri.

Nel grafico 5 sono mostrati i valori di reattività dei 540 sieri esaminati. Nella tabella 5 sono mostrati i risultati del confronto tra ELISA e AGID (il campione dubbio ELISA è stato classificato come positivo) e nella tabella 6 sono riassunte le caratteristiche di performance diagnostica del Kit ELISA.

Grafico 5: Valori di reattività (%) dei 540 sieri (31 positivi e 509 negativi)

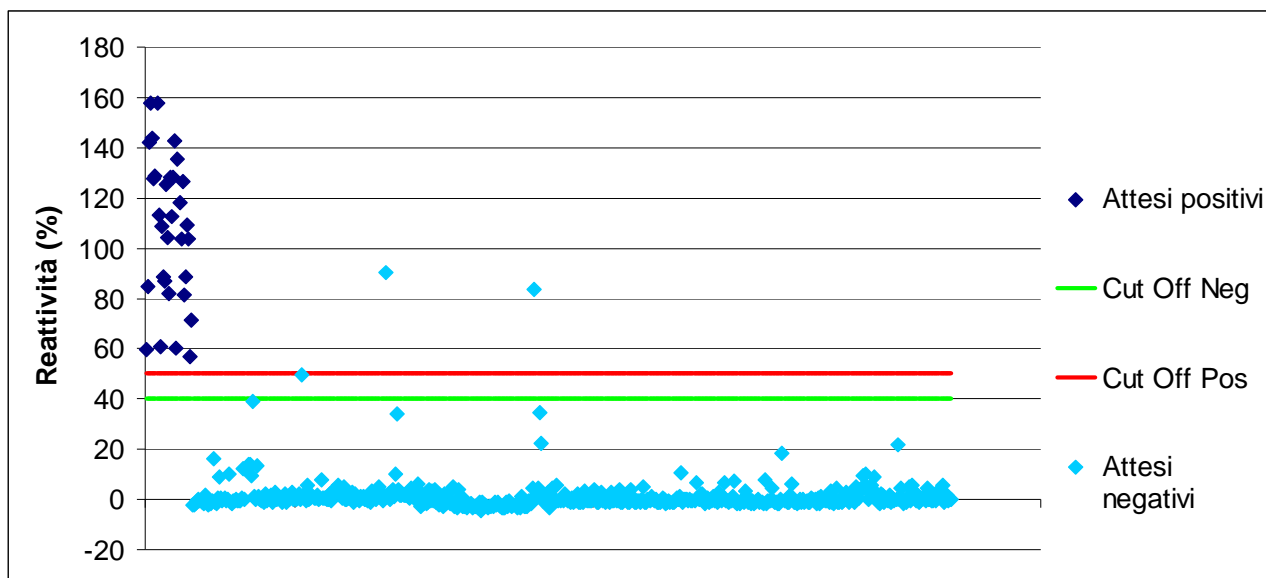


Tabella 5: Confronto tra risultati attesi e risultati ottenuti in ELISA

		ATTESO		
		POSITIVI	NEGATIVI	TOTALE
ELISA	POSITIVI	31	3	34
	NEGATIVI	0	506	506
	TOTALE	31	509	540

Tabella 6: Caratteristiche di performance diagnostica del kit ELISA in validazione

	Valore(%)	- IC 95%	+ IC 95%
Sensibilità	100	100	100
Specificità	99,41	98,75	100 (100,08)
Valore predittivo positivo	91,18	81,64	100 (100,7)
Valore predittivo negativo	100	100	100

Merita un commento il risultato relativo ai 3 soggetti, 2 positivi ed uno dubbio ELISA, attesi come negativi. I tre soggetti sono stati ripetuti, confermando il loro risultato in ELISA e sono stati analizzati anche con l'Immunoblotting. Questa tecnica svela la presenza di anticorpi sierici evidenziando le tre componenti antigeniche più importanti dell'AIE, la p26, la gp45 e la gp90. Si considera positivo un siero che abbia reattività alla p26 più ad almeno una delle due glicoproteine. Tutti e tre sieri sono risultati reattivi alla sola p26, probabilmente, per tale caratteristica, sono stati riconosciuti positivi dall'ELISA. Nell'ottica di un piano di sorveglianza comunque questa estrema sensibilità è una caratteristica ottimale.

5. Ripetibilità

Non essendo disponibile un valore di scarto tipo di riferimento (σ_r), sono state analizzate 30 ripetizioni di un siero positivo di Riferimento Secondario. I dati ottenuti sono stati sottoposti al test di Huber, per evidenziare i dati anomali, al test di Shapiro-Wilk per verificarne la normalità utilizzando il software XL-Stat 2011®, prima di essere utilizzati per il calcolo dello scarto tipo e del coefficiente di variazione.

Lo scarto tipo si ottiene dalla formula seguente:

$$(1) \quad s_r = \sqrt{\frac{\sum (x_i - X)^2}{n-1}}$$

In Allegato, tabella 1 sono mostrati i risultati del test di Huber per le prime 30 ripetizioni. In tabella 2 e nel grafico 1 sono mostrati, rispettivamente, i risultati del test di normalità e l'istogramma relativo ai dati.

Per valutare la ripetibilità si sono analizzati 38 ripetizioni di siero positivo di Riferimento Secondario, dallo stesso operatore, nelle stesse condizioni di prova.

I dati ottenuti sono stati sottoposti al test di Huber, per evidenziare i dati anomali, al test di Shapiro-Wilk utilizzando il software XL-Stat 2011® per verificarne la normalità, prima di essere utilizzati per il calcolo dello scarto tipo e del coefficiente di variazione.

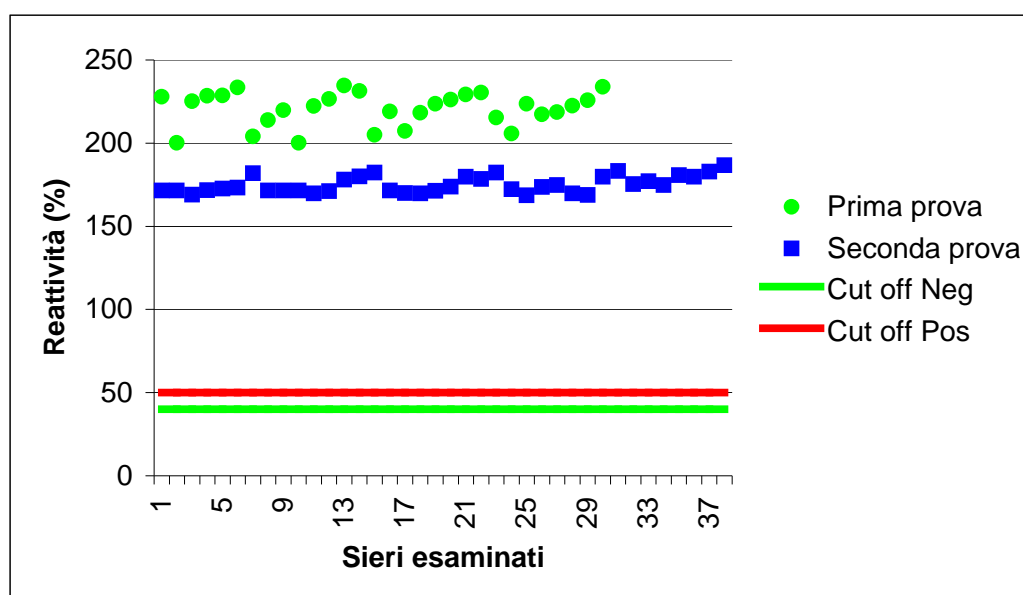
Per la valutazione della ripetibilità verranno confrontate le varianze delle due serie di dati con il test F di Fisher utilizzando il software XL-Stat 2012.

In tabella 3 sono mostrati i risultati del test di Huber per le 38 ripetizioni. In tabella 4 e nel grafico 2 sono mostrati, rispettivamente, i risultati del test di normalità e l'istogramma relativo ai dati. In tabella 5 è riportato il risultato del test F di Fisher per il confronto tra le varianze delle due prove.

I dati, per quanto abbiano mostrato un CV molto basso (rispettivamente 4,3% la prima e 2,6% la seconda) da valutare come molto buono in quanto inferiore al 20% [9], sono risultati nella seconda prova distribuiti non normalmente. Si è comunque deciso di procedere con il test di Fisher che non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le due varianze a confronto. Da notare che le deviazioni standard delle due prove sono risultate molto ridotte (rispettivamente 0,077 e 0,049). Dal punto di vista qualitativo il test ha riportato una ripetibilità del

100% in quanto tutte le ripetizioni sono state qualificate come positive. In grafico 6 sono riportate le reattività delle due prove.

Grafico 6: Reattività delle due prove per la verifica della ripetibilità



6. Riproducibilità

Per la valutazione della riproducibilità si è considerata la duplice natura dell'esito della prova ELISA: la natura qualitativa espressa come categoria (positivo, negativo, dubbio) e quella quantitativa, espressa dalla DO.

La riproducibilità qualitativa è stata valutata effettuando una prova interlaboratorio tra 10 laboratori. A ciascuno è stato chiesto di analizzare 30 sieri e di riportare i risultati sia in termini di DO che qualitativi. Sui risultati è stata valutata la concordanza tra più operatori utilizzando il K multiplo o di Fleiss.

Il K multiplo è risultato essere 0,976, giudicato secondo la classificazione proposta da J. Richard Landis e Gary G. Koch [11] come quasi perfetto (grado massimo di concordanza).

La riproducibilità quantitativa è stata invece valutata effettuando 7 prove differenti (per operatore o per giorno di esecuzione) saggiando minimo 30 ripetizioni di un siero positivo certificato. I dati ottenuti sono stati sottoposti al test di Huber, per evidenziare i dati anomali, al test di Shapiro-Wilk utilizzando il software XL-Stat 2011® per verificarne la normalità, prima di essere utilizzati per il calcolo dello scarto tipo. Successivamente è stato eseguito il test di Levene (test di omogeneità delle varianze) utilizzando l'applicazione XL-Stat.

Lo scarto tipo di riproducibilità (s_R) si è calcolato con la seguente formula (2) da ricontrollare:

$$(2) s_R = \sqrt{\frac{\sum (\text{Varianza} * \text{Numero di repliche per prova})}{\text{Numero totale di prove}}}$$

Numero totale di prove

Nelle Tabelle 6- 21 dell'Allegato sono mostrati i dati delle sette prove con il test di Huber e i test di normalità. Nelle tabelle 22-24 dell'Allegato sono mostrati i risultati dei confronti tra varianze. Nella tabella 22 sono state incluse tutte le prove risultate normali, nella tabella 23 è stata eliminata la prova 3 che aveva una deviazione di 0,112 e inclusa anche la 8 sebbene i dati non siano risultati normali. Nella tabella 24 sono state incluse solo le prove con deviazioni standard simili.

I primi due test hanno rilevato differenze significative, mentre l'ultimo non ha rilevato differenze. I valori di s_R sono stati calcolati in tutti e tre i casi. I risultati sono riassunti in tabella 7.

Tabella 7: Valori di s_R calcolati per ogni test di Levene effettuato

Prove incluse	s_R
1-7	0,056
1,2,4-8	0,037
1,4,6-8	0,039

I valori di s_R , in ogni caso, sono molto ristretti, indice di buona riproducibilità.

CONCLUSIONI

I risultati della validazione del kit ELISA per AIE hanno dimostrato che:

1. specificità analitica: il kit è capace di eliminare le interferenze della matrice siero e non rilevare come positivi sieri reattivi contro altri retrovirus o contro altre virosi equine.
2. sensibilità analitica: il kit presenta un LOD di 1,86 LOG maggiore rispetto all'AGID e presenta una precocità di rilevamento della sieropositività, sia rispetto all'AGID che rispetto a tutti i kit ELISA attualmente in commercio in Italia.
3. performances diagnostiche: il kit presenta sensibilità pari al 100% specificità pari al 98,78%; valore predittivo positivo del 91,18% e valore predittivo negativo pari al 100%. Queste caratteristiche sono compatibili con lo scopo prefissato di utilizzo del test come test di screening.
4. le prove di ripetibilità qualitativa hanno mostrato una ripetibilità del 100%. A livello quantitativo invece le varianze delle prove sono risultate differenti significativamente; questo dato è di rilevanza minore essendo il test principalmente qualitativo. Comunque, vista i valori di sd, si può anche considerarli accettabili.
5. le prove di riproducibilità qualitativa hanno rilevato un valore di K di Cohen di 0.976, da considerarsi ottimale.
6. per la riproducibilità quantitativa, il valore di s_R è di 0,039 indice di riproducibilità molto buona.
7. la classificazione secondo tre categorie, inclusa anche la categoria "dubbio" permette di aumentare la sensibilità del sistema, includendo sì dei falsi positivi ma permettendo di non ottenere falsi negativi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Foil L.D.et al. (1983) Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Crysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*) American Journal Veterinari Research vol 44 n°1 pages 155-156
- 2) Garbarino C. et al. (2006). Un recente focolaio di Anemia Infettiva Equina in provincia di Parma: un'occasione per alcune considerazioni sulla malattia. Il Progresso Veterinario (numero 9)
- 3) Ordinanza 14 novembre (2006). Disposizioni urgenti in materia di sorveglianza dell'anemia infettiva degli equidi Supplemento ordinario alla G.U. Serie generale - n. 285 7-12-2006
- 4) Ordinanza 18 dicembre 2007 Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi. G.U. n.14 del 17-01-2008
- 5) Ordinanza 8 agosto 2010 Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi. G.U. Serie Generale n. 219 del 18 settembre 2010
- 6) Coggins L., Norcross N.L. & Kemen M.J. (1973). The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anaemia. Equine Infect. Dis., III, 177–186.
- 7) Coggins L., Norcross N.L. & Nusbaum S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. Am. J. Vet. Res., 33, 11–18.
- 8) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010, Chapter 2 . 5 . 6 .Equine infectious anaemia
- 9) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010 Chapter 1 . 1 . 4 / 5 "Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases"
- 10) Charles J. Issel, R. Frank Cook (1993)REVIEW ARTICLE A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia J Vet Diagn Invest 5: 137-141
- 11)J. Richard Landis e Gary G. Koch [16] (The measurement of observer agreement for categorical data pubblicato da Biometrics, Vol. 33, pp.159-174 – 1977)

Responsabile Struttura Complessa

Direzione Operativa Diagnosi Malattie Virali e delle Leptosirosi

Gian Luca Autorino

ALLEGATO

ALLEGATO
PROVE DI RIPETIBILITÀ

Tabella 1: Valori di DO e risultati del test di Huber per i dati anomali, con Media, Scarto tipo e Coefficiente di Variazione per le prime 30 ripetizioni di Siero Positivo di Riferimento Secondario

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber		verifica dati anomali
		ri valore assoluto	Rapp. ri/rM <= 4,5	
1	1,645	0,175		Accettabile
2	1,645	0,175		Accettabile
3	1,674	0,146		Accettabile
4	1,682	0,138		Accettabile
5	1,688	0,132		Accettabile
6	1,7	0,120		Accettabile
7	1,75	0,070		Accettabile
8	1,762	0,058		Accettabile
9	1,776	0,044		Accettabile
10	1,783	0,037		Accettabile
11	1,787	0,033		Accettabile
12	1,789	0,031		Accettabile
13	1,795	0,025		Accettabile
14	1,815	0,005		Accettabile
15	1,816	0,004		Accettabile
16	1,824	0,004		Accettabile
17	1,824	0,004		Accettabile
18	1,837	0,017		Accettabile
19	1,841	0,021		Accettabile
20	1,843	0,023		Accettabile
21	1,847	0,027		Accettabile
22	1,857	0,037		Accettabile
23	1,862	0,042		Accettabile
24	1,863	0,043		Accettabile
25	1,867	0,047		Accettabile
26	1,876	0,056		Accettabile
27	1,883	0,063		Accettabile
28	1,9	0,080		Accettabile
29	1,903	0,083		Accettabile
30	1,908	0,088		Accettabile
Numero prove			30	
Media prove ripetibilità (X)			1,80140	
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)			0,077612921	
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)			4,30847791	

Tabella 2: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei dati delle prime 30 ripetizioni di Siero Positivo di Riferimento Secondario

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
1a prova	30	0	30	1,645	1,908	1,801	0,078

Test di Shapiro-Wilk (1a prova):

W	0,922
p-value	0,029
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: Il campione segue una distribuzione Normale

Ha: Il campione non segue una distribuzione Normale

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H0 e accettare l'ipotesi alternativa Ha.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,94%.

Grafico 1: Istogramma dei dati delle prime 30 ripetizioni di Siero Positivo di Riferimento Secondario

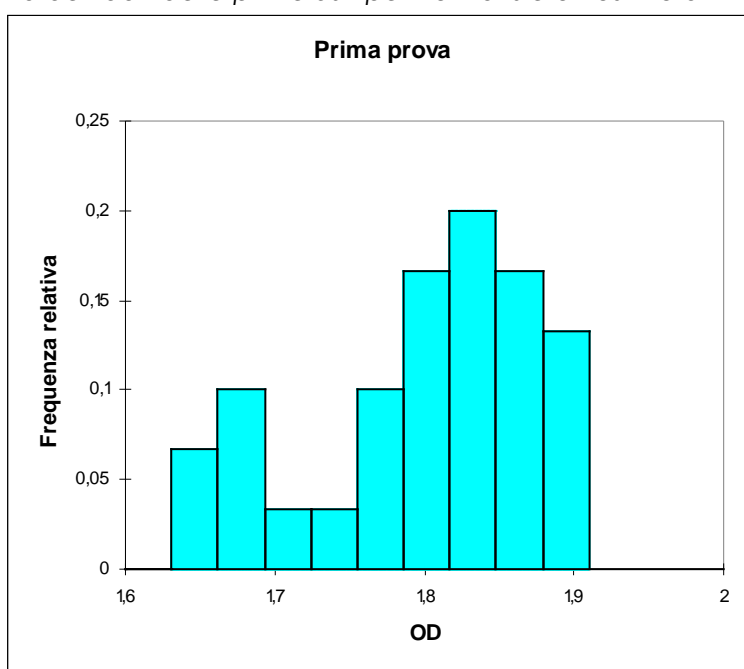


Tabella 3: Valori di DO e risultati del test di Huber per i dati anomali, con Media, Scarto tipo e Coefficiente di Variazione per le 38 ripetizioni di Siero Positivo di Riferimento Secondario

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber	
		r _i valore assoluto	verifica dati anomali Rapp. ri/rM <= 4,5
1	1,846	0,019	Accettabile
2	1,846	0,019	Accettabile
3	1,821	0,044	Accettabile
4	1,847	0,018	Accettabile
5	1,858	0,006	Accettabile
6	1,863	0,002	Accettabile
7	1,949	0,085	Accettabile
8	1,845	0,020	Accettabile
9	1,846	0,019	Accettabile
10	1,846	0,019	Accettabile
11	1,828	0,037	Accettabile
12	1,841	0,024	Accettabile
13	1,91	0,045	Accettabile
14	1,93	0,065	Accettabile
15	1,953	0,089	Accettabile
16	1,845	0,020	Accettabile
17	1,831	0,034	Accettabile
18	1,829	0,036	Accettabile
19	1,843	0,022	Accettabile
20	1,869	0,004	Accettabile
21	1,928	0,063	Accettabile
22	1,915	0,051	Accettabile
23	1,953	0,089	Accettabile
24	1,853	0,012	Accettabile
25	1,816	0,049	Accettabile
26	1,866	0,002	Accettabile
27	1,878	0,013	Accettabile
28	1,828	0,037	Accettabile
29	1,819	0,046	Accettabile
30	1,929	0,065	Accettabile
31	1,963	0,099	Accettabile
32	1,884	0,019	Accettabile
33	1,901	0,037	Accettabile
34	1,879	0,015	Accettabile
35	1,938	0,073	Accettabile
36	1,928	0,063	Accettabile
37	1,958	0,093	Accettabile
38	1,998	0,134	Accettabile
Numero prove			38
Media prove ripetibilità (X)			1,88105
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)			0,049949676
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)			2,655410865

Tabella 4: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei dati delle 38 ripetizioni di Siero Positivo di Riferimento Secondario

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
2a prova	38	0	38	1,816	1,998	1,881	0,050

Test di Shapiro-Wilk (2a prova):

W	0,909
p-value	0,005
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: Il campione segue una distribuzione Normale

Ha: Il campione non segue una distribuzione Normale

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H0 e accettare l'ipotesi alternativa Ha.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 0,45%.

Grafico 2: Istogramma dei dati delle 38 ripetizioni di Siero Positivo di Riferimento Secondario

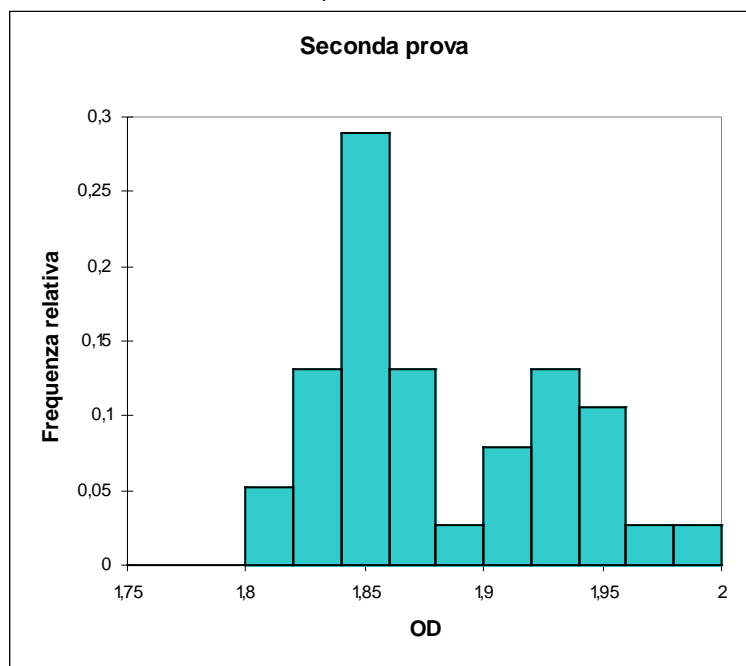


Tabella 5: Test F di Fisher per il confronto tra le varianze delle due prove

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
1a prova	30	0	30	1,645	1,908	1,801	0,078
2a prova	38	0	38	1,816	1,998	1,881	0,050
Rapporto	2,414						
F (Valore osservato)	2,414						
F (Valore critico)	1,983						
GDL1	29						
GDL2	37						
p-value (bilaterale)	0,012						
alfa	0,05						

Interpretazione del testo:

H0: Il rapporto tra le varianze è uguale a 1

Ha: Il rapporto tra le varianze è diverso da 1.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H0 e accettare l'ipotesi alternativa Ha.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 1,20%.

PROVE DI RIPRODUCIBILITÀ

Tabella 6: Do, test di Huber e test di normalità della prova 1

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r_i valore assoluto	Rapp. $r_i/rM \leq 4,5$
1	1,886	0,002	Accettabile
2	1,898	0,010	Accettabile
3	1,9	0,012	Accettabile
4	1,887	0,001	Accettabile
5	1,891	0,003	Accettabile
6	1,921	0,033	Accettabile
7	1,885	0,003	Accettabile
8	1,844	0,044	Accettabile
9	1,865	0,023	Accettabile
10	1,844	0,044	Accettabile
11	1,864	0,024	Accettabile
12	1,905	0,017	Accettabile
13	1,962	0,074	Accettabile
14	1,815	0,073	Accettabile
15	1,889	0,001	Accettabile
16	1,863	0,025	Accettabile
17	1,855	0,033	Accettabile
18	1,853	0,035	Accettabile
19	1,831	0,057	Accettabile
20	1,891	0,003	Accettabile
21	1,915	0,027	Accettabile
22	1,804	0,084	Accettabile
23	1,901	0,013	Accettabile
24	1,805	0,083	Accettabile
25	1,91	0,022	Accettabile
26	1,889	0,001	Accettabile
27	1,892	0,004	Accettabile
28	1,912	0,024	Accettabile
29	1,909	0,021	Accettabile
Numero prove			29
Media prove ripetibilità (X)			1,87883
varianza prove ripetibilità (s2)			0,001341
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)			0,036619
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)			2,9540681

Tabella 7: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 1

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	29	0	29	1,804	1,962	1,879	0,037

Test di Shapiro-Wilk (Prova 1):

W	0,951
p-value	0,192
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla H0.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 19,19%.

Tabella 8: Do, test di Huber e test di normalità della prova 2

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r _i valore assoluto	Rapp. r _i /r _M <= 4,5
1	1,905	0,016	Accettabile
2	1,918	0,003	Accettabile
3	1,961	0,041	Accettabile
4	1,998	0,077	Accettabile
5	1,958	0,037	Accettabile
6	1,955	0,035	Accettabile
7	1,888	0,033	Accettabile
8	1,957	0,037	Accettabile
9	1,882	0,039	Accettabile
10	1,893	0,028	Accettabile
11	1,946	0,025	Accettabile
12	1,939	0,019	Accettabile
13	1,896	0,025	Accettabile
14	1,912	0,009	Accettabile
15	1,92	0,001	Accettabile
16	1,909	0,012	Accettabile
17	1,918	0,003	Accettabile
18	1,926	0,005	Accettabile
19	1,898	0,023	Accettabile
20	1,918	0,003	Accettabile
21	1,929	0,008	Accettabile
22	1,921	0,000	Accettabile
23	1,93	0,009	Accettabile
24	1,957	0,037	Accettabile
25	1,947	0,027	Accettabile
26	1,971	0,051	Accettabile
Numero prove			26
Media prove ripetibilità (X)			1,92724
varianza prove ripetibilità (s ²)			0,000772
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)			0,027782
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)			1,441559

Tabella 9: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 2

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 2	26	0	26	1,882	1,998	1,929	0,029

Test di Shapiro-Wilk (Prova 2):

W	0,970
p-value	0,622
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia
alfa=0,05, non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla H0.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 62,17%.

Tabella 10 : Do, test di Huber e test di normalità della prova 3

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r_i valore assoluto	Rapp. $r_i/rM \leq 4,5$
1	2,017	0,147	Accettabile
2	2,057	0,187	Accettabile
3	2,057	0,187	Accettabile
4	2,094	0,224	Accettabile
5	2,038	0,168	Accettabile
6	2,089	0,219	Accettabile
7	1,93	0,060	Accettabile
8	1,908	0,038	Accettabile
9	1,917	0,047	Accettabile
10	1,907	0,037	Accettabile
11	1,911	0,041	Accettabile
12	1,976	0,106	Accettabile
13	1,955	0,085	Accettabile
14	2,052	0,182	Accettabile
15	1,918	0,048	Accettabile
16	1,838	0,032	Accettabile
17	1,882	0,012	Accettabile
18	1,876	0,006	Accettabile
19	1,865	0,005	Accettabile
20	1,849	0,021	Accettabile
21	1,93	0,060	Accettabile
22	1,932	0,062	Accettabile
23	1,774	0,096	Accettabile
24	1,785	0,085	Accettabile
25	1,773	0,097	Accettabile
26	1,789	0,081	Accettabile
27	1,777	0,093	Accettabile
28	1,758	0,113	Accettabile
29	1,858	0,012	Accettabile
30	1,94	0,070	Accettabile
31	1,757	0,114	Accettabile
32	1,765	0,106	Accettabile
33	1,769	0,102	Accettabile
34	1,776	0,094	Accettabile
35	1,756	0,115	Accettabile
36	1,838	0,032	Accettabile
37	1,857	0,013	Accettabile
38	1,889	0,019	Accettabile
39	1,758	0,113	Accettabile
40	1,798	0,072	Accettabile
41	1,637	0,234	Accettabile
42	1,673	0,198	Accettabile
43	1,863	0,007	Accettabile
44	2,015	0,145	Accettabile
Numero prove			26
Media prove ripetibilità (X)			1,82317

varianza prove ripetibilità (s2)		0,012483067
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)		0,111727647
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)		6,128219056

Tabella 11: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 3

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 3	44	0	44	1,637	2,094	1,877	0,112

Test di Shapiro-Wilk (Prova 3):

W	0,966
p-value	0,219
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla H0.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 21,91%.

Tabella 12: Do, test di Huber e test di normalità della prova 4

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r _i valore assoluto	Rapp. r _i /r _M <= 4,5
1	1,872	0,017	Accettabile
2	1,879	0,023	Accettabile
3	1,832	0,024	Accettabile
4	1,886	0,030	Accettabile
5	1,82	0,036	Accettabile
6	1,786	0,070	Accettabile
7	1,931	0,075	Accettabile
8	1,832	0,024	Accettabile
9	1,81	0,046	Accettabile
10	1,831	0,025	Accettabile
11	1,788	0,068	Accettabile
12	1,835	0,021	Accettabile
13	1,85	0,006	Accettabile
14	1,844	0,012	Accettabile
15	1,969	0,114	Accettabile
16	1,902	0,046	Accettabile
17	1,835	0,021	Accettabile
18	1,851	0,005	Accettabile
19	1,826	0,030	Accettabile
20	1,863	0,007	Accettabile
21	1,919	0,063	Accettabile
22	1,897	0,041	Accettabile
23	1,856	0,000	Accettabile
24	1,868	0,013	Accettabile
25	1,838	0,018	Accettabile
26	1,855	0,001	Accettabile
27	1,812	0,044	Accettabile
28	1,848	0,008	Accettabile
29	1,838	0,018	Accettabile
30	1,881	0,025	Accettabile
31	1,939	0,083	Accettabile
32	1,87	0,015	Accettabile
33	1,829	0,027	Accettabile
34	1,819	0,037	Accettabile
35	1,851	0,005	Accettabile
36	1,886	0,030	Accettabile
37	1,864	0,008	Accettabile
38	1,898	0,042	Accettabile
39	1,942	0,086	Accettabile
40	1,881	0,025	Accettabile
41	1,855	0,001	Accettabile
42	1,911	0,055	Accettabile
43	1,898	0,042	Accettabile
44	1,909	0,053	Accettabile
Numero prove			44
Media prove ripetibilità (X)			1,87367

varianza prove ripetibilità (s2)		0,001695575
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)		0,041177361
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)		2,197688717

Tabella 13: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 4

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 4	44	0	44	1,786	1,969	1,864	0,041

Test di Shapiro-Wilk (Prova 4):

W	0,979
p-value	0,587
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla H0.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 58,70%.

Tabella 14: Do, test di Huber e test di normalità della prova 5

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r _i valore assoluto	Rapp. r _i /r _M <= 4,5
1	1,827	0,022	Accettabile
2	1,793	0,012	Accettabile
3	1,819	0,014	Accettabile
4	1,822	0,017	Accettabile
5	1,835	0,030	Accettabile
6	1,859	0,054	Accettabile
7	1,77	0,035	Accettabile
8	1,812	0,007	Accettabile
9	1,826	0,021	Accettabile
10	1,803	0,002	Accettabile
11	1,822	0,017	Accettabile
12	1,816	0,011	Accettabile
13	1,852	0,047	Accettabile
14	1,834	0,029	Accettabile
15	1,795	0,010	Accettabile
16	1,808	0,003	Accettabile
17	1,811	0,006	Accettabile
18	1,796	0,009	Accettabile
19	1,787	0,018	Accettabile
20	1,816	0,011	Accettabile
21	1,824	0,019	Accettabile
22	1,845	0,040	Accettabile
23	1,766	0,039	Accettabile
24	1,794	0,011	Accettabile
25	1,78	0,025	Accettabile
26	1,807	0,002	Accettabile
27	1,77	0,035	Accettabile
28	1,792	0,013	Accettabile
29	1,846	0,041	Accettabile
30	1,834	0,029	Accettabile
31	1,758	0,047	Accettabile
32	1,769	0,036	Accettabile
33	1,781	0,024	Accettabile
34	1,761	0,044	Accettabile
35	1,781	0,024	Accettabile
36	1,785	0,020	Accettabile
37	1,793	0,012	Accettabile
38	1,829	0,024	Accettabile
39	1,748	0,057	Accettabile
40	1,81	0,005	Accettabile
41	1,79	0,015	Accettabile
42	1,819	0,014	Accettabile
43	1,779	0,026	Accettabile
44	1,774	0,031	Accettabile
Numero prove			44
Media prove ripetibilità (X)			1,79493

varianza prove ripetibilità (s2)		0,000739981
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)		0,027202591
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)		1,515520982

Tabella 15: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 5

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 5	44	0	44	1,748	1,859	1,803	0,027

Test di Shapiro-Wilk (Prova 5):

W	0,984
p-value	0,789
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla H0.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 78,94%.

Tabella 16: Do, test di Huber e test di normalità della prova 6

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		\bar{r}_i valore assoluto	Rapp. $r_i/rM \leq 4,5$
1	1,949	0,002	Accettabile
2	1,965	0,014	Accettabile
3	2,009	0,057	Accettabile
4	2,017	0,065	Accettabile
5	2,021	0,069	Accettabile
6	2,062	0,111	Accettabile
7	1,953	0,002	Accettabile
8	1,914	0,038	Accettabile
9	1,925	0,027	Accettabile
10	1,919	0,033	Accettabile
11	1,951	0,000	Accettabile
12	2,042	0,090	Accettabile
13	1,983	0,032	Accettabile
14	1,913	0,039	Accettabile
15	1,9	0,052	Accettabile
16	1,923	0,029	Accettabile
17	1,929	0,023	Accettabile
18	1,942	0,010	Accettabile
19	1,916	0,036	Accettabile
20	1,931	0,021	Accettabile
21	1,999	0,048	Accettabile
22	1,971	0,020	Accettabile
23	1,931	0,021	Accettabile
24	1,908	0,044	Accettabile
25	1,927	0,025	Accettabile
26	1,927	0,025	Accettabile
27	1,95	0,002	Accettabile
28	1,979	0,028	Accettabile
29	2,013	0,061	Accettabile
30	1,937	0,015	Accettabile
31	1,952	0,000	Accettabile
32	1,964	0,013	Accettabile
33	1,925	0,027	Accettabile
34	1,909	0,043	Accettabile
35	1,962	0,011	Accettabile
36	1,976	0,025	Accettabile
37	2,002	0,050	Accettabile
38	1,998	0,047	Accettabile
39	1,913	0,039	Accettabile
40	2,026	0,074	Accettabile
41	2,021	0,069	Accettabile
Numero prove			41
Media prove ripetibilità (X)			1,95985
varianza prove ripetibilità (s2)			0,001809728
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)			0,042540899

Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) ($p=0,95$)	2,170616074
---	-------------

Tabella 17: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 6

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 6	41	0	41	1,900	2,062	1,960	0,043

Test di Shapiro-Wilk (Prova 6):

W	0,932
p-value	0,016
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H0 e accettare l'ipotesi alternativa Ha.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 1,63%.

Tabella 18: Do, test di Huber e test di normalità della prova 7

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r_i valore assoluto	Rapp. $r_i/rM \leq 4,5$
1	1,849	0,012	Accettabile
2	1,832	0,029	Accettabile
3	1,904	0,043	Accettabile
4	1,831	0,030	Accettabile
5	1,874	0,014	Accettabile
6	1,889	0,029	Accettabile
7	1,908	0,047	Accettabile
8	1,845	0,016	Accettabile
9	1,871	0,011	Accettabile
10	1,862	0,002	Accettabile
11	1,854	0,006	Accettabile
12	1,837	0,024	Accettabile
13	1,845	0,016	Accettabile
14	1,854	0,006	Accettabile
15	1,911	0,051	Accettabile
16	1,831	0,030	Accettabile
17	1,827	0,034	Accettabile
18	1,86	0,000	Accettabile
19	1,821	0,040	Accettabile
20	1,841	0,020	Accettabile
21	1,815	0,046	Accettabile
22	1,864	0,004	Accettabile
23	1,912	0,051	Accettabile
24	1,837	0,024	Accettabile
25	1,816	0,045	Accettabile
26	1,813	0,048	Accettabile
27	1,829	0,032	Accettabile
28	1,868	0,008	Accettabile
29	1,853	0,008	Accettabile
30	1,909	0,049	Accettabile
31	1,907	0,047	Accettabile
32	1,859	0,002	Accettabile
33	1,824	0,037	Accettabile
34	1,833	0,028	Accettabile
35	1,862	0,002	Accettabile
36	1,874	0,014	Accettabile
37	1,861	0,000	Accettabile
38	1,908	0,047	Accettabile
39	1,953	0,093	Accettabile
40	1,898	0,037	Accettabile
41	1,908	0,047	Accettabile
42	1,895	0,035	Accettabile
43	1,911	0,051	Accettabile
44	1,909	0,049	Accettabile
Numero prove			44
Media prove ripetibilità (X)			1,86697

varianza prove ripetibilità (s2)		0,001203015
scarto tipo prove ripetibilità (Sr)		0,034684504
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)		1,857799839

Tabella 19: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 7

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 7	44	0	44	1,813	1,953	1,865	0,035

Test di Shapiro-Wilk (Prova 7):

W	0,936
p-value	0,017
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione alfa=0,05, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H0 e accettare l'ipotesi alternativa Ha.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 1,74%.

Tabella 20: Do, test di Huber e test di normalità della prova 8

N° prova	Valore singola prova ripetibilità	test di Huber verifica dati anomali	
		r_i valore assoluto	Rapp. $r_i/rM \leq 4,5$
1	1,861	0,002	Accettabile
2	1,885	0,027	Accettabile
3	1,871	0,013	Accettabile
4	1,883	0,025	Accettabile
5	1,852	0,006	Accettabile
6	1,888	0,029	Accettabile
7	1,892	0,033	Accettabile
8	1,827	0,032	Accettabile
9	1,847	0,012	Accettabile
10	1,847	0,012	Accettabile
11	1,827	0,032	Accettabile
12	1,852	0,006	Accettabile
13	1,857	0,002	Accettabile
14	1,905	0,047	Accettabile
15	1,883	0,025	Accettabile
16	1,828	0,031	Accettabile
17	1,817	0,042	Accettabile
18	1,99	0,132	Accettabile
19	1,829	0,030	Accettabile
20	1,826	0,033	Accettabile
21	1,839	0,020	Accettabile
22	1,906	0,047	Accettabile
23	1,892	0,033	Accettabile
24	1,826	0,033	Accettabile
25	1,832	0,027	Accettabile
26	1,805	0,054	Accettabile
27	1,819	0,040	Accettabile
28	1,826	0,033	Accettabile
29	1,853	0,006	Accettabile
30	1,939	0,081	Accettabile
31	1,832	0,027	Accettabile
32	1,84	0,019	Accettabile
33	1,836	0,023	Accettabile
34	1,858	0,000	Accettabile
35	1,859	0,000	Accettabile
36	1,865	0,006	Accettabile
37	1,899	0,041	Accettabile
38	1,953	0,095	Accettabile
39	1,899	0,041	Accettabile
40	1,919	0,061	Accettabile
41	1,901	0,043	Accettabile
Numero prove			41
Media prove ripetibilità (X)			1,86500
varianza prove ripetibilità (s2)			0,002058351

scarto tipo prove ripetibilità (Sr)		0,040457385
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)		3,329479181

Tabella 21: Test di Shapiro Wilk per la verifica della normalità dei della prova 8

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 8	41	0	41	1,805	1,990	1,865	0,040

Test di Shapiro-Wilk (Prova 8):

W	0,923
p-value	0,009
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: La variabile da cui è stato estratto il campione segue una distribuzione Normale.

Ha: La variabile da cui è stato estratto il campione no segue una distribuzione Normale.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione alfa=0,05, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H0 e accettare l'ipotesi alternativa Ha.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 0,87%.

Tabella 22: Test di Levene sulle 7 prove risultate distribuite normalmente

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	44	15	29	1,804	1,962	1,879	0,037
Prova 2	44	18	26	1,882	1,998	1,929	0,029
Prova 3	44	0	44	1,637	2,094	1,877	0,112
Prova 4	44	0	44	1,786	1,969	1,864	0,041
Prova 5	44	0	44	1,748	1,859	1,803	0,027
Prova 6	44	3	41	1,900	2,062	1,960	0,043
Prova 7	44	0	44	1,813	1,953	1,865	0,035

Test di Levene (Media) / Test bilaterale (Prova 1):

F (Valore osservato)	23,97768484
F (Valore critico)	2,132878156
GDL1	6
GDL2	265
p-value (unilaterale)	< 0,0001
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: Le varianze sono identice.

Ha: Almeno una delle varianze è diversa da un'altra.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H_0 e accettare l'ipotesi alternativa H_a .

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H_0 mentre è vera è inferiore a 0,01%.

Tabella 23: Test di Levene sulle prove 1-2;4-8.

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	44	15	29	1,804	1,962	1,879	0,037
Prova 2	44	18	26	1,882	1,998	1,929	0,029
Prova 4	44	0	44	1,786	1,969	1,864	0,041
Prova 5	44	0	44	1,748	1,859	1,803	0,027
Prova 6	44	3	41	1,900	2,062	1,960	0,043
Prova 7	44	0	44	1,813	1,953	1,865	0,035
Prova 8	44	3	41	1,805	1,990	1,865	0,040

Test di Levene (Media) / Test bilaterale (Prova 1):

F (Valore osservato)	2,169300301
F (Valore critico)	2,133273719
GDL1	6
GDL2	262
p-value (unilaterale)	0,046338622
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H_0 : Le varianze sono identiche.

H_a : Almeno una delle varianze è diversa da un'altra.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$, si dovrebbe rifiutare l'ipotesi nulla H_0 e accettare l'ipotesi alternativa H_a .

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H_0 mentre è vera è inferiore a 4,63%.

Tabella 24: Test di Levene sulle prove 1,4,6-8

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Oss. con dati mancanti	Oss. senza dati mancanti	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	44	15	29	1,804	1,962	1,879	0,037
Prova 4	44	0	44	1,786	1,969	1,864	0,041
Prova 6	44	3	41	1,900	2,062	1,960	0,043
Prova 7	44	0	44	1,813	1,953	1,865	0,035
Prova 8	44	3	41	1,805	1,990	1,865	0,040

Test di Levene (Media) / Test bilaterale (Prova 1):

F (Valore osservato)	0,640
F (Valore critico)	2,418
GDL1	4
GDL2	194
p-value (unilaterale)	0,635
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

H0: Le varianze sono identiche.

Ha: Almeno una delle varianze è diversa da un'altra.

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia $\alpha=0,05$, non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla H0.

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 63,49%.