



**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**  
**SEDE – 00178 Roma/Capannelle – Via Appia Nuova, 1411**  
**Tel. (06) 79099.1 (centralino) – Fax (06) 79340724 <http://www.izslt.it> - E-mail:**  
**[webmaster@izslt.it](mailto:webmaster@izslt.it)**



# **VALIDAZIONE DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO LA p26 DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA NEL SIERO DI EQUIDI**

**Redatto da:**

**Dott. Gian Luca Autorino, Dott. Roberto Nardini, Dott.ssa Maria Teresa Scicluna**

---

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>VALIDAZIONE</b> .....	7
<u>1. Definizione dello scopo del test</u> .....	8
1.1 Idoneità allo scopo .....	8
1.2. Idoneità all'utilizzo .....	8
<u>2. Sviluppo del test: studi sperimentali</u> .....	9
<u>3. Caratteristiche di performance analitica</u> .....	11
3.1 Specificità analitica .....	11
3.2 Sensibilità analitica .....	12
3.3 Ripetibilità .....	13
3.4 Riproducibilità .....	14
3.5 Controllo delle performance del metodo .....	15
<u>4 Caratteristiche di performance diagnostiche</u> .....	16
4.1 Sensibilità e specificità diagnostica .....	16
<u>5 Interpretazione dei risultati del test</u> .....	18
5.1 Valore predittivo positivo e negativo .....	18
5.2 Efficacia del test e test bias .....	18
<b>CONCLUSIONI</b> .....	20
APPENDICE I .....	22
APPENDICE II .....	29
APPENDICE III .....	31
APPENDICE IV .....	34
APPENDICE V .....	35
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	48

# *INTRODUZIONE*

L'Anemia Infettiva Equina (AIE) è un'infezione ad eziologia virale degli equidi, sostenuta da un virus della famiglia Retroviridae, genere Lentivirus. Questo virus ha tropismo per i monociti-macrofagi e in virtù di questa caratteristica invade diversi organi, principalmente milza, reni, polmoni, fegato e linfonodi.

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.

Sperimentalmente [3] l'infezione può decorrere con una fase acuta iniziale caratterizzata da febbre, inappetenza, edemi ed emorragie, che esita generalmente in una forma cronica con episodi febbrili ricorrenti. Più frequentemente può presentarsi in una forma inapparente che in momenti di stress può riacutizzarsi. L'infezione dal virus dell'AIE (AIEV) ha carattere persistente.

Dal 2006, l'Italia attua un piano nazionale di sorveglianza per AIE [4;5;6] 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 abbattuti o 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 da descritto da Coggins [7;8].

Questo test ricerca anticorpi contro le strutture antigeniche del virus; gli antigeni virali impiegati possono essere rappresentati da virus intero o da singole proteine virali (p26, gp45 e gp90), sintetiche o ricombinanti. Tra questi, l'antigene più comunemente utilizzato nei diversi kit (commerciali e non) è la p26, in quanto questa proteina capsidica è altamente conservata nei diversi stadi virali.

Questa tecnica è di semplice esecuzione ma ha un limite di rilevabilità elevato: campioni con bassi titoli anticorpali possono non presentare linee di precipitazione. Inoltre, 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 consentissero una diagnosi precoce dell'infezione. 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 [9]. L'IB e la PCR, per le loro caratteristiche di esecuzione e per le caratteristiche della viremia nell'infezione da AIEV non sono adottabili come test di screening.

Sono stati proposti alcuni protocolli ELISA [10] la cui applicazione non appare vantaggiosa rispetto al test di Coggins: il primo di questi, un ELISA competitivo che rileva anticorpi contro la p26, presenta un limite di rilevabilità alto, necessario ad ovviare a problemi di specificità; il secondo utilizza come antigeni peptidi sintetici della gp45, per cui non è noto il grado di conservazione. È stato proposto anche un ELISA [11] che utilizza la gp45 e la gp90, ma gli stessi autori consigliano il loro utilizzo contestualmente alla p26.

Sulla base di tutte queste evidenze e considerazioni è stato svolto il progetto IZS LT 001/98 "Sviluppo di metodiche ELISA per la diagnosi sierologica dell'Anemia Infettiva Equina mediante l'impiego di antigeni ricombinanti e anticorpi monoclonali" [12]. Da suddetto progetto è stato sviluppato il test ELISA competitivo oggetto di questa validazione.

In breve, il test utilizza un metodo immunoenzimatico di tipo competitivo in fase semi-liquida. Prevede un tempo di contatto tra il siero in esame e l'antigene p26. La miscela siero-antigene è di seguito trasferita su una piastra adsorbita con un anticorpo monoclonale anti p26 (catcher). Durante questa fase, la presenza di anticorpi anti AIEV impedisce il legame tra la p26 e il catcher. La presenza di anticorpi nel campione è rilevata mediante l'aggiunta di un altro anticorpo monoclonale anti p26 (tracer) coniugato con perossidasi. In base allo sviluppo del

colore, in seguito all'aggiunta di un substrato enzimatico, si determina l'esito della prova, qualificabile come positivo, negativo o dubbio. La specificità di questo schema di reazione è assicurata proprio dalla presenza dei due anticorpi monoclonali. Infatti, alcuni sieri che determinano la formazione di bande aspecifiche in AGID, confermati come negativi in IB, sono risultati negativi con questo protocollo ELISA.

Per una trattazione esaustiva si rimanda alla procedura in appendice I.

# **VALIDAZIONE**

Per la validazione del test, e nella seguente trattazione della stessa, sono state seguite le linee guida riportate nel Manuale OIE [13] e nella procedura gestionale interna dell'IZSLT [14].

## **1. Definizione dello scopo del test**

### **1.1 Idoneità allo scopo**

Il manuale OIE stabilisce che il metodo e le relative procedure di un test devono essere idonee allo scopo prefissato.

Al fine di aumentare l'efficacia dei controlli condotti attraverso il Piano di Sorveglianza e poter reclutare il maggior numero di soggetti positivi utilizzando il test ELISA come screening, sono stati scelti valori soglia mirati ad aumentare la sensibilità diagnostica, prevedendo e valutando come accettabile la conseguente diminuzione della specificità. Ciò tenendo in considerazione che le conferme di positività in ELISA, devono essere effettuate in AGID.

### **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:

*Costo per analisi:* la valutazione comparata tra i costi per analisi tra AGID ed ELISA è stata effettuata valutando le quantità di reagenti che le due tecniche richiedono. Ogni ml di antigene (p26) utilizzato in Agid (metodo Coggins) è sufficiente per esaminare circa 60 campioni; lo stesso volume consente di testare circa 3000 campioni in ELISA. Altra considerazione riguarda la proteina p26 ricombinante utilizzata nel test ELISA. Questo reagente deriva da un processo di produzione alternativo e più economico, che determina inoltre una consistente riduzione del numero di risultati aspecifici, rispetto a quelli che si possono verificare impiegando antigeni virali ottenuti da tessuto coltura.

*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 3 criteri di validazione e sull'applicazione di una formula per il calcolo dei valori di soglia e della percentuale di inibizione 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 quasi tutti i reagenti necessari per l'esecuzione della prova. L'utilizzatore si deve fornire solamente di reagenti di facile reperibilità.

*Requisiti di trasporto:* il kit necessita di essere mantenuto ad una temperatura di -20°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.

## **2. Sviluppo del test: studi sperimentali**

Per la trattazione esaustiva di questa parte si rimanda alla relazione del progetto IZS LT 001/98 "Sviluppo di metodiche ELISA per la diagnosi sierologica dell'anemia infettiva equina mediante l'impiego di antigeni ricombinanti e anticorpi monoclonali".

In breve, l'allestimento del nuovo ELISA è il risultato di diversi processi riassunti di seguito:

1. Clonaggio della sequenza codificante la p26: si è proceduto all'amplificazione del cDNA, disponibile come inserto clonato nel sito di restrizione *BamHI* del plasmide *pUC18*, con dei primer selezionati con l'ausilio del programma *OLIGO 5*; alla digestione dell'amplificato con degli enzimi di restrizione e quindi al clonaggio nel vettore di espressione di proteine di fusione *pTHIOHIS reading frame "B"*. Questo costruito è stato utilizzato per la trasformazione di una coltura di *E. Coli TOP10*, poi esaminata per verificarne la presenza.

2. Induzione dell'espressione ed estrazione delle proteine di fusione: nelle colonie di TOP10 è stata indotta l'espressione delle proteine di fusione, controllata dal promotore *trc* di *pTHIOSIS*, mediante l'aggiunta di *isopropil-β-tiogalattopiranoside (IPTG)*. Si è proceduto quindi alla raccolta e al rilevamento delle proteine di fusione mediante elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide (*SDS-PAGE*), seguito da un *western blotting*, utilizzando sieri equini positivi al test di *Coggins* e sieri anti IgG di cavallo coniugati con fosfatasi alcalina.
3. Produzione degli anticorpi monoclonali (Mab): i Mab sono stati prodotti immunizzando topi *Balb/c* tramite inoculazione sottocutanea del ceppo Wyoming con adiuvante di *Freund*, e successivamente, senza adiuvante e per via intraperitoneale. Al terzo giorno dall'ultimo inoculo gli splenociti dei topi immunizzati sono stati fusi con cellule di mieloma murino NS0. Lo screening degli ibridomi è stato eseguito mediante ELISA indiretta con antigene virale. Un'ulteriore verifica è stata condotta con immunofluorescenza indiretta su monostrato cellulare infetto e non e con *western blotting*. Gli ibridomi selezionati sono stati clonati e inoculati su topi *Balb/c*, pretrattati con *Pristane* per la produzione di liquido ascitico. Parte delle asciti è stata coniugata con perossidasi.
4. Prove di competizione: in una piastra ELISA è stato adsorbito il virus parzialmente purificato e per ciascun Mab è stata verificata la capacità di competere, per il legame all'antigene, con le asciti marcate degli altri monoclonali.
5. Allestimento ELISA competitivo: sulla base dei risultati ottenuti dalle prove è stata allestita una reazione ELISA di tipo competitivo, impiegando come catcher il monoclonale che è risultato non competere con gli altri e come tracer, alternativamente gli altri monoclonali marcati. Per il calcolo dei valori soglia sono stati testati sieri acquistati presso il Laboratorio di Referenza OIE (National Veterinary Services Laboratories USDA) per AIE, e sieri di campo analizzati con il metodo *Coggins*. Per l'espressione del risultato del

campione in esame si applica l'equazione riportata in appendice I che trasforma il valore di densità ottica del campione in un valore di percentuale di inibizione rispetto al controllo negativo.

6. Prova di applicabilità: per verificare l'applicabilità del test è stata condotta una prova interlaboratorio tra le unità operative coinvolte nel progetto di ricerca richiedendo di esaminare in ELISA 40 campioni di siero equino forniti in cieco, ottenuti da 20 campioni di siero certificati dall'USDA.

Durante il processo di allestimento, sono stati rispettati i prerequisiti ritenuti essenziali dal manuale OIE per gli studi sperimentali.

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana opera infatti all'interno di un Sistema Qualità ISO 17025 che prevede l'osservanza di procedure operative standard, il controllo del mantenimento e della calibrazione di tutte le apparecchiature utilizzate e il controllo del mantenimento della qualifica del personale impiegato.

I sieri utilizzati per la messa a punto del metodo e la sua validazione provengono dal USDA oppure sieri di campo inviati per conferma presso il Centro di Referenza Nazionale.

### **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).

La selettività di questo ELISA è stata valutata attraverso una modifica dell'esecuzione della prova, impiegando soluzioni di lavaggio non contenenti detergenti. Questi detergenti sono utilizzati per l'eliminazione di sostanze che possono essere contenute nei campioni e che interferiscono con la formazione di immunocomplessi. La prova eseguita con questa modifica è stata messa a confronto con il metodo standard analizzando sieri certificati. La modifica della

prova interferisce con l'esito, non essendo stati identificati correttamente i sieri esaminati. L'esecuzione secondo procedura conferisce alla prova caratteristiche di selettività, classificando correttamente i sieri indipendentemente dalla presenza di sostanze interferenti.

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 sieri positivi per altri Retrovirus: FIV (Virus dell'Immunodeficienza Felina), FeLV (Virus della Leucemia felina), BELV (Virus della Leucosi Bovina Enzootica), Virus della Visna Maedi. Ogni siero è stato analizzato in 10 ripetizioni. Tutti i sieri sono risultati negativi.

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 [15].

### **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 di un siero positivo in siero negativo. Questo confronto ha indicato che l'ELISA ha un limite di rilevabilità di circa  $3 \text{ Log}_{10}$  inferiore rispetto al Coggins. Inoltre un siero certificato come debolmente positivo in AGID ha prodotto un segnale di forte positività in ELISA anche quando saggiato alla stessa diluizione indicata precedentemente (1:1000).

### 3.3 Ripetibilità

Non essendo disponibile un valore di scarto tipo di riferimento ( $\sigma_r$ ), è stato utilizzato come valore di riferimento per la valutazione della ripetibilità il valore di  $s_r$  calcolato seguendo la procedura interna. Sono state effettuate 30 ripetizioni di un siero negativo di Riferimento Internazionale. 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.

Per il test di Huber e il calcolo dello scarto tipo sono stati utilizzati i fogli di lavoro Excel allegati alla PG QUA 011 rev. 10. In appendice II sono riportati i valori di densità ottica (OD) del siero negativo, i risultati del test di Shapiro-Wilk e del test di Huber.

Lo scarto tipo si ottiene dalla formula seguente:

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

Il valore di scarto tipo ottenuto è 0,184.

Il valore di  $s_r$  è stato considerato adatto per la valutazione della ripetibilità in quanto non si discosta dai valori ottenuti per altre prove sierologiche [16] accreditate presso lo stesso laboratorio.

Per valutare la ripetibilità sono state analizzate 30 ripetizioni di siero negativo di Riferimento Internazionale, 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.

Per il test di Huber e il calcolo dello scarto tipo sono stati utilizzati i fogli di lavoro Excel allegati alla PG QUA 011 rev. 10. Per la valutazione della ripetibilità sono state confrontate le varianze delle due serie di dati con il test F di Fisher utilizzando il software XL-Stat 2011®, che ha dato un risultato di 1,3532 con un valore di p di 0,42; questo valore non risulta statisticamente significativo quindi possiamo concludere che l'ELISA è ripetibile.

In appendice III sono riportati i valori di OD del siero negativo della seconda prova, i risultati del test di Huber, del test di Shapiro-Wilk e del test F di Fisher per il confronto tra le due varianze.

### **3.4 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 OD.

La riproducibilità qualitativa è stata valutata attraverso un Ring test tra le U.O. coinvolte nel progetto di ricerca, testando 40 campioni di siero forniti in cieco, ottenuti da 20 campioni di siero certificati (6 negativi e 14 positivi). Sui risultati è stata valutata la concordanza tra più operatori utilizzando il K multiplo o di Fleiss calcolato tramite il foglio di lavoro Excel allegato alla PG QUA 011 rev.10. Il valore di K è risultato essere 0,967, indice di un elevato grado di accordo tra gli operatori e, di conseguenza, di un alto grado di riproducibilità. In appendice IV è riportata la tabella del calcolo del K multiplo.

La riproducibilità quantitativa è stata invece valutata secondo quanto descritto dalla PG QUA 011 rev.10 e dal Manuale OIE. Sono state effettuate 7 prove differenti (per operatore o per giorno di esecuzione) saggiando 30 ripetizioni di un siero negativo 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. Il test ha fornito un valore uguale a 1,843 con un valore di p di 0,092. Questo valore non risulta statisticamente significativo quindi possiamo concludere che l'ELISA è riproducibile.

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

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

Numero totale di prove

Il valore di  $s_R$  è risultato essere 0,129.

In appendice V sono riportati i valori di OD del siero negativo delle 7 prove, i risultati del test di Huber, di Shapiro-Wilk, e di Levene e del calcolo di  $s_R$ .

### **3.5 Controllo delle performance del metodo**

Per il controllo di qualità, con i dati a nostra disposizione e precedentemente esposti si è proceduto alla messa a punto di una carta di controllo dell'ELISA, al fine di verificare la stabilità statistica del metodo nel tempo.

A questo scopo si è proceduto alla stima dell'incertezza di misura che è un parametro, associato al risultato di una misurazione, il quale caratterizza la dispersione dei valori attribuibile al misurando. Questa dispersione viene espressa attraverso l'incertezza estesa ed è espressa come il prodotto tra lo  $s_R$  e il fattore di copertura ( $k$ ). Un valore di  $k=2$  è utilizzato per ottenere un intervallo con un livello di fiducia circa del 95% e  $k=3$  per un intervallo con livello di fiducia approssimativamente del 99%.

Per ogni lotto di produzione del kit ELISA si procederà alla stima della media del controllo negativo ( $m$ ), effettuando almeno 7 repliche in 7 sedute.

Si definiranno quindi i limiti di affidabilità ed allarme (superiore ed inferiore) del lotto applicando le seguenti formule (3;4):

$$(3) \quad LA_{f_{INF}}=m -(2* s_R) \quad LA_{f_{SUP}}=m +(2* s_R)$$

$$(4) \quad LA_{I_{INF}}=m -(3* s_R) \quad LA_{I_{SUP}}=m +(3* s_R)$$

Ci si aspetta che nell'intervallo tra i due limiti di affidabilità siano compresi almeno il 95% dei valori di OD del siero negativo e che nell'intervallo tra i limiti di allarme siano compresi almeno il 99% di questi. Se, dopo almeno 30 prove dal primo impiego del lotto di SPR, oltre il 5% dei risultati risulterà fuori dai Limiti di Affidabilità e/o più del 1% supererà i Limiti di Allarme, si procederà alla sospensione dell'esecuzione della prova fino a conclusione della verifica del sistema.

## 4 Caratteristiche di performance diagnostiche

### 4.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La valutazione della sensibilità (Dse) e della specificità diagnostica (Dsp) è stata condotta utilizzando come Gold Standard (GS) la tecnica AGID metodo Coggins. I valori di Dse e Dsp attesi, utilizzati per il calcolo della Dse e Dsp del test sono rispettivamente 0,99 e 0,80, stabilendo un valore di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5%. Essendo lo scopo di questo test lo screening della popolazione, i valori di Dse e Dsp attesi sono stati scelti avendo come obiettivo quello di ottenere un test molto sensibile, prevedendo e valutando come accettabile la conseguente diminuzione della specificità.

La numerosità minima del campione da analizzare è stata calcolata utilizzando le formule seguenti (5;6)

$$(5) n = \frac{t^2 * Dse_{attesa} * (1 - Dse_{attesa})}{d^2}$$

$$(6) n = \frac{t^2 * Dsp_{attesa} * (1 - Dsp_{attesa})}{d^2}$$

Dove :

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

Dsp<sub>attesa</sub>: Specificità diagnostica attesa

Dse<sub>attesa</sub>: Sensibilità diagnostica attesa

d: precisione assoluta desiderata

Per la formula (5) il numero minimo di campioni è 26; per la formula (6) il numero minimo di campioni è 425. Sono stati analizzati un numero totale di campioni pari a 1095.

I campioni utilizzati provengono da:

- Sieri di campo disponibili presso il Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina ed il Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini (440)
- Sieri disponibili presso la collezione European Union-Reference Laboratory analizzati da ANSES Dozulé Laboratory for Equine Diseases (655)



Nella Tabella 1 sono riportati i risultati dell'ELISA a confronto con il test di Coggins.

		COGGINS TEST		Totale
		+	-	
ELISA	+	857	47	<b>904</b>
	-	0	191	<b>191</b>
Totale		<b>857</b>	<b>238</b>	<b>1095</b>

Tabella 1: Confronto tra tecnica ELISA ed AGID condotto su 1095 campioni

Per il calcolo della Dse e della Dsp sono stati utilizzati i rapporti esemplificati nella seguente tabella (tabella 2):

	Positivi al GS	Negativi al GS
Positivi al test	a	b
Negativi al test	c	d

Tabella 2: Tabella di contingenza (2x2) per il confronto tra un test diagnostico e il GS di riferimento

$$(7) Dse = a/(a+c)$$

$$(8) Dsp = d/(b+d)$$

In tabella 3 sono riportati i valori di Dsp e Dse calcolate con i livelli di confidenza e la precisione assoluta prima riportate.

<b>Dse (%)</b>	<b>100</b>
<b>Dsp (%)</b>	<b>80,3</b>

Tabella 3: Valori di Dse e Dsp diagnostica calcolati su 1095 campioni con una sensibilità attesa del 99%, una specificità attesa del 80%, un livello di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5 %

In merito al valore di specificità, anche se valutato come buono, è da sottolineare che una certa percentuale di campioni risulta negativa in AGID e positiva in ELISA ed è stata successivamente confermata come positiva in IB. Questo causa una riduzione del valore di specificità dell'ELISA, rispetto a quello che si otterrebbe utilizzando come GS l'IB e indica che, in realtà, l'AGID può risultare meno sensibile dell'ELISA.

Questa considerazione è rafforzata anche dall'evidenza che il valore di LOD dell'ELISA risulta inferiore rispetto a quello dell'AGID.

## 5 Interpretazione dei risultati del test

### 5.1 Valore predittivo positivo e negativo

Il valore predittivo è stato calcolato utilizzando i seguenti rapporti, esemplificati nella tabella 2.

$$(9) \text{ Valore predittivo positivo:} \\ a/(a+b)$$

$$(10) \text{ Valore predittivo negativo:} \\ c/(c+d)$$

In tabella 4 sono riportati il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo calcolati con i livelli di confidenza e la precisione assoluta prima esposte.

<b>Valore predittivo positivo (%)</b>	<b>94,8</b>
<b>Valore predittivo negativo (%)</b>	<b>100</b>

Tabella 4: Valore predittivo positivo e negativo calcolati su 1095 campioni con una sensibilità attesa del 99%, una specificità attesa del 80%, un livello di confidenza del 99% ed una precisione assoluta del 5 %

### 5.2 Efficacia del test e test bias

Sulla base del campione utilizzato per la stima delle caratteristiche diagnostiche sono state valutate anche l'efficacia del test e il test bias [17].

L'efficacia è stata calcolata con la formula seguente (riferendosi alla tabella 2):

$$(11) \text{ Efficacia} = (a+d)/N * 100$$

Per questo test è risultata essere del 95,7%. L'efficacia complessiva del test risulta dalla proporzione tra veri positivi e veri negativi sul totale degli esaminati e rappresenta la percentuale complessiva di soggetti il cui stato sanitario viene identificato correttamente dal test.

Il test bias valuta l'errore insito nel test usato e può essere anche interpretato come il rapporto tra prevalenza apparente e reale. Qualora risulti superiore a 1 il test sovrastima la malattia; se inferiore ad 1 la malattia viene sottostimata. Il test bias è stato calcolato utilizzando il seguente rapporto (riferendosi alla tabella 2):

$$(12) \text{ Test bias} = (a+b)/(a+c)$$

Il test ELISA in oggetto è risultato avere un valore pari a 1,05 indice di stima della malattia congruente con lo scopo del test.

In tabella 5 sono riportati i valori di efficacia e di test bias ottenuti:

<b>Efficacia</b>	<b>95,7%</b>
<b>Test bias</b>	<b>1,05</b>

Tabella 5: Valori di efficacia e test Bias dell'ELISA

# ***CONCLUSIONI***

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici e pratici l'impiego dell'ELISA risponde alle necessità di riduzione di costi di produzione, dei tempi di risposta e, soprattutto, all'esigenza di avere criteri di lettura oggettivi e confrontabili.

Il metodo sottoposto a validazione risponde ai requisiti prescritti dal *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010*. In particolare, risulta possedere caratteristiche intrinseche adeguate allo scopo per cui è stato sviluppato in termini di specificità e sensibilità analitica non reagendo con sieri positivi per altri Retrovirus ed avendo un LOD di oltre 3 log<sub>10</sub> inferiore rispetto all'AGID, considerato come test di riferimento.

Le caratteristiche di ripetibilità, riproducibilità intra ed interlaboratorio e di concordanza ne rendono possibile l'impiego e la sua diffusione a tutti i laboratori di diagnostica sierologica in possesso di adeguate capacità professionali e requisiti strumentali.

La specificità diagnostica del test, valutata in rapporto all'immunodiffusione risulta essere buona e migliora in relazione all'immunoblotting, metodo dotato di maggiore sensibilità rispetto al citato metodo ufficiale di conferma.

Tuttavia, le sue performance in termini di elevata sensibilità diagnostica e specificità analitica, riconoscendo il 100% dei campioni positivi al metodo di conferma di riferimento, lo rendono particolarmente indicato come test di screening da impiegare nel corso di programmi di controllo e di eradicazione essendo in grado di reclutare il maggior numero di soggetti reattivi.

Ciò, in particolare, se si considera che ogni positività deve essere successivamente confermata presso il Laboratorio di riferimento nazionale.

## APPENDICE I

*CTB-Elisa per la ricerca di anticorpi verso il virus dell'anemia infettiva equina (AIEV)*

**1. PRINCIPIO DEL METODO**

Il metodo viene impiegato per la ricerca di anticorpi diretti contro la proteina capsidica p26 del virus dell'Anemia Infettiva Equina ed è basato su una ELISA di tipo "complextrapping- blocking" Elisa.

Nella metodica viene impiegata una forma ricombinante della proteina capsidica p26 del virus dell'AIE e due anticorpi monoclonali (Mab), diretti contro epitopi diversi della proteina stessa.

Lo schema della reazione prevede una prima fase di "contatto" tra il siero in esame e la p26 ricombinante. Successivamente, la miscela "siero-p26" viene posta a contatto con uno dei due Mab (catcher), precedentemente adsorbito ad una piastra ELISA. Viene infine aggiunto il secondo Mab (tracer), coniugato con l'enzima perossidasi (HRP): l'eventuale presenza, nel siero in esame, di anticorpi diretti contro la p26, ostacolerà l'interazione tra la p26 ricombinante con uno, o tutti e due i Mab. In entrambi i casi si avrà l'inibizione dello sviluppo della colorazione, che dovrebbe seguire all'aggiunta del substrato cromogeno dell'HRP. La positività di un campione determina quindi l'inibizione dello sviluppo della colorazione.

La tecnica prevede le seguenti fasi:

- 1) adsorbimento del Mab "catcher" alla micropiastra "Nunc Maxisorp"
- 2) cicli di lavaggio
- 3) distribuzione ed incubazione dei sieri in esame e dell'antigene nella micropiastra di contatto
- 4) trasferimento della miscela sieri - antigene sulla micropiastra adsorbita
- 5) aggiunta ed incubazione del Mab "tracer"
- 6) cicli di lavaggio
- 7) distribuzione del substrato cromogeno e successivo arresto della reazione
- 8) lettura della densità ottica

NB: La fase di contatto tra la p26 ricombinante ed i sieri in esame viene eseguita in una piastra a 96 pozzetti con fondo a "U", detta piastra di contatto, che deve essere in plastica "inerte" e non permette l'adsorbimento della miscela p26 ricombinante/sieri; la competizione tra i sieri in esame ed i due Mab viene invece eseguita in una seconda piastra a 96 pozzetti ("Nunc Maxisorp"), detta piastra di rilevamento.

**2. APPARECCHIATURE**

Micropipettatrice multicanale in grado di erogare volumi variabili da 10-50 µl

Micropipettatrice multicanale in grado di erogare volumi variabili da 50-250 µl

Micropipettatrice singola in grado di erogare volumi variabili da 10-20 µl

Micropipettatrice singola in grado di erogare volumi variabili da 20-200 µl

Pipettatrice

Incubatore termostatico (+ 37°C ± 3°C)

Agitatore rotante per micropiastre (opzionale)

Agitatore per micropiastre

Frigorifero (+ 4°C ± 2°C)

Congelatore (-20°C ± 5°C)

Fotometro per la lettura in assorbanza delle micropiastre ( $\lambda$  utilizzata 490-492 nm),  
Sistema di lavaggio per piastre (opzionale, consigliabile in caso si eseguano esami impiegando contemporaneamente numerose piastre)

pHmetro

### **3. MATERIALI DI LABORATORIO**

Micropiastre a 96 pozzetti con fondo piatto (Nunc Maxisorp o altro articolo verificato come idoneo)

Micropiastre a 96 pozzetti in plastica "inerte"

Coperchi per micropiastre

Puntali

Vaschette porta reagenti

Pipette, provette e vetreria di volume adeguato per la preparazione dei reagenti

### **4. REAGENTI**

*4.1. Anticorpo monoclonale anti-p26 "catcher" per la sensibilizzazione delle micropiastre di rilevamento*

Soluzione: 50% glicerina/50% PBS

Conservazione: in congelatore a temperatura -20°C ± 5°C

Validità: indicata in etichetta

Titolo d'uso: indicata in etichetta

NB: preparare la soluzione per l'adsorbimento contenente il "catcher" alla diluizione d'uso di volta in volta e solo immediatamente prima dell'uso in Tampone

Carbonato Bicarbonato (vedi punto 7)

*4.2. Antigene p26*

Soluzione: antigene ricombinante p26 ricostituito in PBS al 50% di glicerina

Conservazione: in congelatore a temperatura -20°C ± 5°C

Validità: indicata in etichetta

Titolo d'uso: indicato in etichetta

NB: preparare la soluzione, di volta in volta, solo immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente (vedi punto 10)

*4.3. Anticorpo monoclonale anti-p26 coniugato con persossidasi "tracer"*

Soluzione: 50% glicerina/50% PBS

Conservazione: in congelatore a temperatura di -20°C ± 5°C

Validità: indicata in etichetta

Titolo d'uso: indicato in etichetta

NB: Preparare la diluizione d'uso, di volta in volta, solo immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente (vedi punto 10)

*4.4. Siero di controllo negativo*

Siero di cavallo negativo per la presenza di anticorpi nei confronti del virus dell'AIE

Soluzione: 50% glicerina/50% siero

Conservazione: in congelatore a temperatura -20°C ± 5°C

Validità: indicata in etichetta

Titolo d'uso: tal quale

*4.5. Siero di controllo positivo*

Siero equino positivo di referenza

Soluzione: 50% glicerina/50% siero

Conservazione: in congelatore a temperatura  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Validità: indicata in etichetta

Titolo d'uso: tal quale

#### 4.6. Siero di topo o immunoglobuline di topo

Usato come additivo del tampone di diluizione dei sieri in esame

Conservazione: secondo istruzioni del fornitore

Validità: secondo istruzioni del fornitore

#### 4.7. Tampone Carbonato-Bicarbonato

Composizione per litro:

sodio carbonato anidro 1,59 g

sodio bicarbonato 2,93 g

acqua demineralizzata qb a 1000 ml

Preparazione: sciogliere i sali nell'acqua mediante agitazione, controllare il pH ( $9,6 \pm 0,2$ )

Conservazione:  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Validità: tre mesi

#### 4.8. Tampone PBS

Composizione per litro:

cloruro di sodio 8 g

potassio cloruro 0,2 g

sodio fosfato bibasico  $\times 12\text{H}_2\text{O}$  2,9 g

potassio fosfato monobasico 0,2 g

acqua demineralizzata qb a 1000 ml

Preparazione: sciogliere i sali nell'acqua mediante agitazione, controllare il pH ( $7,4 \pm 0,2$ )

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: tre mesi

#### 4.9. Tampone Lavaggio

Composizione:

PBS pH  $7,4 \pm 0,2$ , contenente Tween 20

(Polyoxyethylene-sorbitan monolaureate) allo 0,05% v/v

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: sette giorni

#### 4.10. Tampone Diluente

Composizione:

Tampone Lavaggio contenente estratto di lievito al'1% v/v

Conservazione:  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Validità: 24 ore (si consiglia di preparare volumi non superiori ai quantitativi necessari nell'arco di un giorno)

#### 4.11. Tampone di diluizione dei sieri

Composizione:

Tampone Diluente addizionato con siero di topo all'1% o altra soluzione di immunoglobuline di topo 1% (es. liquido ascitico inerte nei confronti della specifica reazione antigene-anticorpo)

Conservazione:  $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Validità: 24 ore (si consiglia di preparare volumi non superiori ai quantitativi da impiegare nell'arco di un giorno)



Nota: le immunoglobuline di topo prevengono la reazione aspecifica che alcuni anticorpi presenti nei sieri equini hanno nei confronti di eventuali antigeni di origine murina.

#### 4.12. *Tampone Fosfato-Citrato*

Composizione per litro:

Acido citrico 0,1 M 493 ml

Sodio fosfato bibasico 0,2M 507 ml

Preparazione: miscelare le due soluzioni, controllare il pH ( $5 \pm 0,2$ )

Conservazione:  $+4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Validità: tre mesi

Categoria di rischio: l'acido citrico (R41-37/38; S26-36) è irritante per le vie respiratorie e la pelle

#### 4.13. *Soluzione Substrato Cromogeno*

Composizione per litro:

OPD (ortophenylendiamine in pasticche pre-pesate) 0,5 mg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (perossido di idrogeno) allo 0,02%, abitualmente vengono usate soluzioni al 30% o al 35%; manipolare con guanti protettivi

Preparazione:

Sciogliere le pasticche di OPD nel volume appropriato di tampone fosfato-citrato (vedi punto 12), portato a temperatura ambiente. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in concentrazione dello 0,02% finale (esempio: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% deve essere diluito 1/1500; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35% deve essere diluito 1/750; per un volume di 21 ml di soluzione di OPD, aggiungere 14 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% o 12 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35%)

Conservazione:

La soluzione di OPD eventualmente preparata in eccesso, prima dell'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, può essere aliquotata e conservata in congelatore a  $-20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ .

Tali aliquote andranno scongelata al buio subito prima dell'uso. Eliminare la soluzione se al momento dell'impiego si nota un viraggio anche lieve della soluzione da incolore a giallo. Dopo l'aggiunta dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la soluzione non è stabile ed è anche fotosensibile, pertanto, deve essere utilizzata immediatamente.

Validità: tre mesi

Categoria di Rischio: l'OPD in polvere è potenzialmente cancerogeno (R45, 20-22, 36-38, 42,43; S 45, 26, 36-37, 39).

Tuttavia, la concentrazione di OPD nella soluzione d'uso è inferiore ai limiti di legge previsti per l'apposizione di specifiche frasi di rischio. Manipolare polvere e soluzioni indossando guanti protettivi. Eliminare la soluzione in eccedenza secondo le procedure previste.

#### 4.14. *Soluzione di arresto: Acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M*

Composizione: Acido solforico (96%) 56 ml

Acqua distillata qb a 1000 ml

Preparazione: Aggiungere lentamente e con cautela l'acido all'acqua, quindi portare a volume. Evitare assolutamente di effettuare l'operazione inversa.

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: 12 mesi

## 5. PROCEDURA DELLA PROVA

### 5.1 ADSORBIMENTO

- Dispensare in ogni pozzetto della piastra di rilevamento (Nunc Maxisorp), 50 µl di Mab "catcher" per pozzetto, diluito al titolo d'uso in tampone carbonato bicarbonato.

Assicurarsi che la distribuzione del liquido nei pozzetti sia omogenea attraverso l'osservazione del livello del menisco. Coprire la piastra ed incubarla in posizione statica per 18-24 ore ad una temperatura di 4°C ± 2°C. Al termine della fase di incubazione, svuotare la micropiastra capovolgendola con movimento deciso per eliminare i residui di liquido e scuotendola su materiale assorbente.

- Distribuire in ogni pozzetto 150-200 µl di tampone di lavaggio ed attendere almeno 2 minuti. Ripetere 3 volte tale operazione. Trascorso tale periodo, vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

### 5.2 DISTRIBUZIONE DEI CONTROLLI, DEI SIERI IN ESAME E DELL'ANTIGENE

Si riporta lo schema di distribuzione di sieri e controlli nella "piastra di contatto" (riportata graficamente nella figura 1A). Tale schema ha un valore indicativo, e si riferisce ad una piastra completa. Per ragioni di praticità, la procedura sotto riportata fa riferimento ad esso; qualora si usassero schemi di distribuzione diversi, assicurarsi che siano rispettate le diluizioni ed il numero delle repliche previste per i controlli ed i sieri in esame.

**Fig. 1A. PIASTRA DI CONTATTO**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ctrl reaz		5		13		21		29		37	
B	bianc o		6		14		22		30		38	
C	ctrl pos		7		15		23		31		39	
D	ctrl neg		8		16		24		32		40	
E	1		9		17		25		33		41	
F	2		10		18		26		34		42	
G	3		11		19		27		35		43	
H	4		12		20		28		36		44	

Fig. 1B. PIASTRA DI RILEVAMENTO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ctrl reaz	ctrl reaz	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
B	bianc o	bianc o	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
C	ctrl pos	ctrl pos	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
D	ctrl neg	ctrl neg	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
E	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
F	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
G	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
H	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44

Nota: Questo schema di distribuzione consente un riconoscimento immediato della corretta posizione dei campioni nel momento in cui vengono trasferiti dalla piastra di contatto a quella di rilevamento per averli, dopo questa operazione, in doppia replica.

Piastra di contatto:

Distribuzione del tampone di diluizione dei sieri:

- 60 µl nel pozzetto A1 (controllo della reazione)
- 120 µl nel pozzetto B1 (bianco)
- 40 µl nei pozzetti C1 (controllo siero positivo) e D1 (controllo siero negativo) e nei rimanenti pozzetti della colonna 1 ed in tutti i pozzetti delle colonne 3, 5, 7, 9 e 11.

Distribuzione dei sieri:

- Nel pozzetto C1, distribuire 20 µl di siero di controllo positivo
- Nel pozzetto D1, 20 µl di siero di controllo negativo
- Nei pozzetti dedicati ai campioni in esame, distribuire 20 µl di ciascun campione, seguendo la numerazione riportata nella figura 1A.

Per tutte le operazioni sostituire ogni volta i puntali per evitare cross contaminazioni tra i campioni in esame.

Distribuzione della proteina ricombinante ed incubazione:

- Dispensare 60 µl di antigene p26 in tutti i pozzetti della piastra, tranne che nel pozzetto B1, previa diluizione dello stesso immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente.
- Coprire la piastra e quindi incubare per 60 minuti a 37 °C in agitazione o 75 minuti in posizione statica.

### 5.3 TRASFERIMENTO DELLA MISCELA SIERO-ANTIGENE DALLA PIASTRA DI CONTATTO A QUELLA DI RILEVAMENTO ED AGGIUNTA DEL Mab "tracer"

Alcuni minuti prima del termine dell'incubazione della piastra di contatto, effettuare il lavaggio della piastra "adsorbita" con il Mab "catcher" come descritto nel punto 5.1.

Al termine dell'incubazione della piastra di contatto (punto 5.2), seguendo lo schema indicato in figura 1B, trasferire nella piastra di rilevamento due aliquote da 50 µl, sia dai pozzetti della miscela controlli-antigene (A1, B1, C1 e D1), che dai

pozzetti delle miscele siero-antigene di ogni controllo/campione e trasferirle in modo da esaminarli in doppio.

- Aggiungere in tutti i pozzetti della piastra di rilevamento 25 µl di MAb "tracer", precedentemente diluito nel Tampone Diluente.
- Coprire le piastra e quindi incubare per 60 minuti a 37 °C in agitazione o 75 minuti in posizione statica.
- Terminata l'incubazione, vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

#### 5.4 LAVAGGIO

- Distribuire in ogni pozzetto 150-200 µl di tampone di lavaggio
- Attendere almeno 2 minuti e vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

Ripetere le operazione descritte complessivamente 3 volte.

#### 5.5 REAZIONE CROMOGENA

- Alcuni minuti prima del termine dell'incubazione della piastra di rilevamento, scongelare al buio il substrato cromogeno eventualmente preparato e stoccato.
- Aggiungere l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al substrato cromogeno alla concentrazione finale dello 0,02%
- Distribuire 50 µl del substrato in ogni pozzetto
- Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente

#### 5.6 BLOCCO DELLA REAZIONE

- Al termine delle operazioni di cui al punto 5.5, aggiungere in tutti i pozzetti 50 µl della soluzione di arresto

#### 5.7 LETTURA

- Rilevare immediatamente le assorbanze (DO) dei pozzetti, ad una lunghezza d'onda di 492 nm, eseguendo il bianco contro aria.

#### 5.8 VALIDITA' DELLA PROVA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per la validità della prova è necessario rispettare i seguenti requisiti:

- media delle repliche del controllo antigene OD ≥ 1,000
- differenza fra l'OD medio delle repliche del controllo negativo e positivo ≥ 0,8
- bianco: media dei valori di OD < alla media dei valori dell'OD del controllo positivo e comunque non > a 0,3.

Per ogni campione in esame, calcolare la percentuale d'inibizione (PI) secondo il seguente algoritmo:

$$PI = 100 - \left[ \frac{OD_{\text{media delle repliche del campione in esame}} \times 100}{OD_{\text{media delle repliche del controllo negativo}}} \right]$$

- Il campione è NEGATIVO se PI < 30%
- Il campione è POSITIVO se PI > 50%
- Il campione è DUBBIO se 30% < PI < 50%, estremi compresi

## APPENDICE II

Valori di OD di 30 ripetizioni di sieri negativo di riferimento

1,866	1,468	1,769	1,823
1,768	1,598	1,774	1,566
1,533	1,664	1,404	1,309
1,465	1,551	1,47	1,268
1,508	1,479	1,482	1,367
1,56	1,567	1,379	1,484
1,741	1,56	1,661	1,954
1,889	1,891		

## Test di Huber

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		$r_i$ valore assoluto	Rapp. $r_i/r_M \leq 4,5$
1	1,866	0,306	Accettabile
2	1,768	0,208	Accettabile
3	1,533	0,027	Accettabile
4	1,465	0,095	Accettabile
5	1,508	0,052	Accettabile
6	1,56	0,000	Accettabile
7	1,741	0,181	Accettabile
8	1,889	0,329	Accettabile
9	1,468	0,092	Accettabile
10	1,598	0,038	Accettabile
11	1,664	0,104	Accettabile
12	1,551	0,009	Accettabile
13	1,479	0,081	Accettabile
14	1,567	0,007	Accettabile
15	1,56	0,000	Accettabile
16	1,891	0,331	Accettabile
17	1,769	0,209	Accettabile
18	1,774	0,214	Accettabile
19	1,404	0,156	Accettabile
20	1,47	0,090	Accettabile
21	1,482	0,078	Accettabile
22	1,379	0,181	Accettabile
23	1,661	0,101	Accettabile
24	1,954	0,394	Accettabile
25	1,823	0,263	Accettabile
26	1,566	0,006	Accettabile
27	1,309	0,251	Accettabile
28	1,268	0,292	Accettabile
29	1,367	0,193	Accettabile
30	1,484	0,076	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,268
Valore massimo ripetibilità	1,954
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato ( $v=n-1$ ; $p=0,95$ )	2,045
Media prove ripetibilità (X)	1,593
Varianza prove ripetibilità ( $s^2$ )	0,034
Scarto tipo prove ripetibilità (Sr)	0,184
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) ( $p=0,95$ )	11,53
Mediana prove ripetibilità	1,560
Mediana delle differenze (rM)	0,103
Limite ripetibilita' del metodo (r)	0,531

### Test di Shapiro-Wilk

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
A	30	1,268	1,954	1,594	0,184

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,958
p-value	0,269
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 superiore al livello di significatività 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 26.89%.

## APPENDICE III

Valori di OD di 30 ripetizioni di sieri negativo di riferimento

1,394	1,433	1,68	1,555
1,388	1,552	1,405	1,828
1,522	1,542	1,532	1,871
1,692	1,672	1,639	1,533
1,631	1,706	1,669	1,627
1,769	1,737	1,735	1,757
1,909	1,933	1,776	1,752
1,744	1,973		

## Test di Huber

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		$r_i$ valore assoluto	Rapp. $r_i/rM \leq 4,5$
1	1,394	0,282	Accettabile
2	1,388	0,288	Accettabile
3	1,522	0,154	Accettabile
4	1,692	0,016	Accettabile
5	1,631	0,045	Accettabile
6	1,769	0,093	Accettabile
7	1,909	0,233	Accettabile
8	1,744	0,068	Accettabile
9	1,433	0,243	Accettabile
10	1,552	0,124	Accettabile
11	1,542	0,134	Accettabile
12	1,672	0,004	Accettabile
13	1,706	0,030	Accettabile
14	1,737	0,061	Accettabile
15	1,973	0,297	Accettabile
16	1,68	0,004	Accettabile
17	1,405	0,271	Accettabile
18	1,532	0,144	Accettabile
19	1,639	0,037	Accettabile
20	1,669	0,007	Accettabile
21	1,735	0,059	Accettabile
22	1,555	0,121	Accettabile
23	1,828	0,152	Accettabile
24	1,871	0,195	Accettabile
25	1,533	0,143	Accettabile
26	1,627	0,049	Accettabile
27	1,757	0,081	Accettabile
28	1,776	0,100	Accettabile
29	1,752	0,076	Accettabile
30	1,933	0,257	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,388
Valore massimo ripetibilità	1,973
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato ( $v=n-1$ ; $p=0,95$ )	2,045
Media prove ripetibilità ( $\bar{X}$ )	1,665
Varianza prove ripetibilità ( $s^2$ )	0,025
Scarto tipo prove ripetibilità ( $Sr$ )	0,158
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) ( $p=0,95$ )	9,488
Mediana prove ripetibilità	1,676
Mediana delle differenze ( $rM$ )	0,111
Limite ripetibilita' del metodo ( $r$ )	0,457

### Test di Shapiro Wilk

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massim o	Media	Deviazione std.
B	30	1,388	1,973	1,665	0,158

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,971
p-value	0,580
alfa	0,05

Interpretazione del testo:

$H_0$ : Il campione segue una distribuzione normale

$H_a$ : Il campione non segue una distribuzione Normale

Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significatività della soglia  $\alpha=0,05$  non è possibile rifiutare l'ipotesi nulla  $H_0$

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla  $H_0$  mentre è vera è 58,04%.



## Test F di Fisher

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
A	30	1,268	1,954	1,594	0,184
B	30	1,388	1,973	1,665	0,158

Test F di Fisher / Test bilaterale:

Rapporto	1,353
F (Valore osservato)	1,353
F (Valore critico)	2,101
GDL1	29
GDL2	29
p-value (bilaterale)	0,420
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 superiore al livello di significatività 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 42,03%.

## APPENDICE IV

*K multiplo*

Tabella K Multiplo				
	Po	pe	p0-pe	1-pe
Operatore_1	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_2	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_3	0,975	0,570	0,405	0,430
Operatore_4	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_5	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_6	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_7	0,925	0,610	0,315	0,390
Operatore_8	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_9	0,950	0,600	0,350	0,400
Operatore_10	1,000	0,580	0,420	0,420
Operatore_11	1,000	0,580	0,420	0,420
			k_multiplo	0,967

## APPENDICE V

*Dati delle prove di riproducibilità*

Ripetizione	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Prova 4	Prova 5	Prova 6	Prova 7
1	1,768	1,784	1,394	2,09	1,826	2,082	1,972
2	1,533	1,644	1,388	1,989	2,018	2,142	2,082
3	1,465	1,591	1,522	2,045	1,764	2,101	1,894
4	1,508	1,627	1,692	1,782	1,663	1,897	1,954
5	1,56	1,674	1,631	2,107	1,736	2,066	1,839
6	1,741	1,717	1,769	2,085	1,946	2,135	1,837
7	1,889	1,731	1,909	2,017	1,669	2,346	2,012
8	1,468	1,746	1,744	2,002	1,577	2,192	2,036
9	1,598	1,729	1,433	2,096	1,566	2,019	1,766
10	1,664	1,637	1,552	2,157	1,594	2,083	1,870
11	1,551	1,599	1,542	2,201	1,955	2,194	1,765
12	1,479	1,578	1,672	2,072	1,989	2,151	1,792
13	1,567	1,634	1,706	1,985	1,766	2,234	1,793
14	1,56	1,69	1,737	2,049	1,684	2,258	1,877
15	1,774	1,909	1,973	2,235	1,7	2,187	1,879
16	1,404	1,791	1,68	2,16	1,654	2,068	1,957
17	1,47	1,852	1,405	2,17	1,817	2,112	1,753
18	1,482	1,694	1,532	2,209	2,047	2,072	1,678
19	1,379	1,545	1,639	1,943	2,044	2,241	1,652
20	1,661	1,561	1,669	1,985	1,814	2,075	1,685
21	1,566	1,483	1,735	1,989	1,74	2,137	1,669
22	1,309	1,618	1,555	2,128	1,714	2,201	1,621
23	1,484	1,717	1,828	2,143	1,718	2,294	1,705
24	1,593	1,655	1,871	2,27	1,848	2,187	1,801
25	1,766	1,844	1,533	2,085	2,071	2,135	1,951
26	1,543	1,751	1,627	1,98	1,96	1,979	1,931
27	1,591	1,589	1,757	1,959	1,82	2,022	1,749
28	1,745	1,398	1,776	1,939	1,758	1,908	1,738
29	1,72	1,626	1,752	2,082	1,677	2,009	1,605
30	1,541	1,665	1,933	2,207	1,694	2,033	1,571

## Huber test Prova 1

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		r <sub>i</sub> valore assoluto	Rapp. r <sub>i</sub> /r <sub>M</sub> <= 4,5
1	1,768	0,208	Accettabile
2	1,533	0,027	Accettabile
3	1,465	0,095	Accettabile
4	1,508	0,052	Accettabile
5	1,56	0,000	Accettabile
6	1,741	0,181	Accettabile
7	1,889	0,329	Accettabile
8	1,468	0,092	Accettabile
9	1,598	0,038	Accettabile
10	1,664	0,104	Accettabile
11	1,551	0,009	Accettabile
12	1,479	0,081	Accettabile
13	1,567	0,007	Accettabile
14	1,56	0,000	Accettabile
15	1,774	0,214	Accettabile
16	1,404	0,156	Accettabile
17	1,47	0,090	Accettabile
18	1,482	0,078	Accettabile
19	1,379	0,181	Accettabile
20	1,661	0,101	Accettabile
21	1,566	0,006	Accettabile
22	1,309	0,251	Accettabile
23	1,484	0,076	Accettabile
24	1,593	0,033	Accettabile
25	1,766	0,206	Accettabile
26	1,543	0,017	Accettabile
27	1,591	0,031	Accettabile
28	1,745	0,185	Accettabile
29	1,72	0,160	Accettabile
30	1,541	0,019	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,309
Valore massimo ripetibilità	1,889
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato (v=n-1; p=0,95)	2,045
Media prove ripetibilità (X)	1,579
Varianza prove ripetibilità (s <sup>2</sup> )	0,018
Scarto tipo prove ripetibilità (Sr)	0,133
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)	8,430
Mediana prove ripetibilità	1,560
Mediana delle differenze (r <sub>M</sub> )	0,086
Limite ripetibilità del metodo (r)	0,385

## Prova 2

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		ri valore assoluto	Rapp. $r_i/r_M \leq 4,5$
1	1,784	0,124	Accettabile
2	1,644	0,016	Accettabile
3	1,591	0,069	Accettabile
4	1,627	0,033	Accettabile
5	1,674	0,014	Accettabile
6	1,717	0,057	Accettabile
7	1,731	0,071	Accettabile
8	1,746	0,086	Accettabile
9	1,729	0,069	Accettabile
10	1,637	0,023	Accettabile
11	1,599	0,061	Accettabile
12	1,578	0,082	Accettabile
13	1,634	0,026	Accettabile
14	1,69	0,030	Accettabile
15	1,909	0,249	Accettabile
16	1,791	0,131	Accettabile
17	1,852	0,192	Accettabile
18	1,694	0,034	Accettabile
19	1,545	0,115	Accettabile
20	1,561	0,099	Accettabile
21	1,483	0,177	Accettabile
22	1,618	0,042	Accettabile
23	1,717	0,057	Accettabile
24	1,655	0,005	Accettabile
25	1,844	0,184	Accettabile
26	1,751	0,091	Accettabile
27	1,589	0,071	Accettabile
28	1,398	0,262	Accettabile
29	1,626	0,034	Accettabile
30	1,665	0,005	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,398
Valore massimo ripetibilità	1,909
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato ( $v=n-1$ ; $p=0,95$ )	2,045
Media prove ripetibilità (X)	1,67
Varianza prove ripetibilità ( $s^2$ )	0,012
Scarto tipo prove ripetibilità ( $S_r$ )	0,109
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) ( $p=0,95$ )	6,540
Mediana prove ripetibilità	1,660
Mediana delle differenze (rM)	0,069
Limite ripetibilità' del metodo (r)	0,316

## Prova 3

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		ri valore assoluto	Rapp. $ri/rM \leq 4,5$
1	1,394	0,282	Accettabile
2	1,388	0,288	Accettabile
3	1,522	0,154	Accettabile
4	1,692	0,016	Accettabile
5	1,631	0,045	Accettabile
6	1,769	0,093	Accettabile
7	1,909	0,233	Accettabile
8	1,744	0,068	Accettabile
9	1,433	0,243	Accettabile
10	1,552	0,124	Accettabile
11	1,542	0,134	Accettabile
12	1,672	0,004	Accettabile
13	1,706	0,030	Accettabile
14	1,737	0,061	Accettabile
15	1,973	0,297	Accettabile
16	1,68	0,004	Accettabile
17	1,405	0,271	Accettabile
18	1,532	0,144	Accettabile
19	1,639	0,037	Accettabile
20	1,669	0,007	Accettabile
21	1,735	0,059	Accettabile
22	1,555	0,121	Accettabile
23	1,828	0,152	Accettabile
24	1,871	0,195	Accettabile
25	1,533	0,143	Accettabile
26	1,627	0,049	Accettabile
27	1,757	0,081	Accettabile
28	1,776	0,100	Accettabile
29	1,752	0,076	Accettabile
30	1,933	0,257	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,388
Valore massimo ripetibilità	1,973
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato ( $v=n-1$ ; $p=0,95$ )	2,045
Media prove ripetibilità (X)	1,66
Varianza prove ripetibilità ( $s^2$ )	0,025
Scarto tipo prove ripetibilità ( $Sr$ )	0,158
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) ( $p=0,95$ )	9,488
Mediana prove ripetibilità	1,676
Mediana delle differenze (rM)	0,111
Limite ripetibilità del metodo (r)	0,457

## Prova 4

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		ri valore assoluto	Rapp. ri/rM <= 4,5
1	2,09	0,006	Accettabile
2	1,989	0,094	Accettabile
3	2,045	0,039	Accettabile
4	1,782	0,302	Accettabile
5	2,107	0,024	Accettabile
6	2,085	0,002	Accettabile
7	2,017	0,067	Accettabile
8	2,002	0,082	Accettabile
9	2,096	0,013	Accettabile
10	2,157	0,074	Accettabile
11	2,201	0,118	Accettabile
12	2,072	0,011	Accettabile
13	1,985	0,098	Accettabile
14	2,049	0,035	Accettabile
15	2,235	0,152	Accettabile
16	2,16	0,077	Accettabile
17	2,17	0,087	Accettabile
18	2,209	0,126	Accettabile
19	1,943	0,141	Accettabile
20	1,985	0,098	Accettabile
21	1,989	0,094	Accettabile
22	2,128	0,045	Accettabile
23	2,143	0,059	Accettabile
24	2,27	0,187	Accettabile
25	2,085	0,002	Accettabile
26	1,98	0,104	Accettabile
27	1,959	0,125	Accettabile
28	1,939	0,145	Accettabile
29	2,082	0,002	Accettabile
30	2,207	0,124	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,782
Valore massimo ripetibilità	2,27
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato (v=n-1; p=0,95)	2,045
Media prove ripetibilità (X)	2,072
Varianza prove ripetibilità (s <sup>2</sup> )	0,011
Scarto tipo prove ripetibilità (Sr)	0,107
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)	5,168
Mediana prove ripetibilità	2,084
Mediana delle differenze (rM)	0,084
Limite ripetibilità del metodo (r)	0,31

## Prova 5

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		ri valore assoluto	Rapp. ri/rM <= 4,5
1	1,826	0,065	Accettabile
2	2,018	0,257	Accettabile
3	1,764	0,003	Accettabile
4	1,663	0,098	Accettabile
5	1,736	0,025	Accettabile
6	1,946	0,185	Accettabile
7	1,669	0,092	Accettabile
8	1,577	0,184	Accettabile
9	1,566	0,195	Accettabile
10	1,594	0,167	Accettabile
11	1,955	0,194	Accettabile
12	1,989	0,228	Accettabile
13	1,766	0,005	Accettabile
14	1,684	0,077	Accettabile
15	1,7	0,061	Accettabile
16	1,654	0,107	Accettabile
17	1,817	0,056	Accettabile
18	2,047	0,286	Accettabile
19	2,044	0,283	Accettabile
20	1,814	0,053	Accettabile
21	1,74	0,021	Accettabile
22	1,714	0,047	Accettabile
23	1,718	0,043	Accettabile
24	1,848	0,087	Accettabile
25	2,071	0,310	Accettabile
26	1,96	0,199	Accettabile
27	1,82	0,059	Accettabile
28	1,758	0,003	Accettabile
29	1,677	0,084	Accettabile
30	1,694	0,067	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,566
Valore massimo ripetibilità	2,071
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato (v=n-1; p=0,95)	2,045
Media prove ripetibilità (X)	1,794
Varianza prove ripetibilità (s <sup>2</sup> )	0,022
Scarto tipo prove ripetibilità (Sr)	0,148
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)	8,221
Mediana prove ripetibilità	1,761
Mediana delle differenze (rM)	0,086
Limite ripetibilità del metodo (r)	0,427



## Prova 6

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		ri valore assoluto	Rapp. ri/rM <= 4,5
1	2,082	0,042	Accettabile
2	2,142	0,019	Accettabile
3	2,101	0,023	Accettabile
4	1,897	0,227	Accettabile
5	2,066	0,058	Accettabile
6	2,135	0,011	Accettabile
7	2,346	0,223	Accettabile
8	2,192	0,069	Accettabile
9	2,019	0,105	Accettabile
10	2,083	0,040	Accettabile
11	2,194	0,071	Accettabile
12	2,151	0,027	Accettabile
13	2,234	0,111	Accettabile
14	2,258	0,135	Accettabile
15	2,187	0,063	Accettabile
16	2,068	0,055	Accettabile
17	2,112	0,011	Accettabile
18	2,072	0,051	Accettabile
19	2,241	0,118	Accettabile
20	2,075	0,048	Accettabile
21	2,137	0,014	Accettabile
22	2,201	0,078	Accettabile
23	2,294	0,171	Accettabile
24	2,187	0,063	Accettabile
25	2,135	0,011	Accettabile
26	1,979	0,145	Accettabile
27	2,022	0,102	Accettabile
28	1,908	0,216	Accettabile
29	2,009	0,115	Accettabile
30	2,033	0,091	Accettabile

Numero prove	30
Valore minimo ripetibilità	1,897
Valore massimo ripetibilità	2,346
Gradi di libertà	29
t di Student tabulato (v=n-1; p=0,95)	2,045
Media prove ripetibilità (X)	2,119
Varianza prove ripetibilità (s <sup>2</sup> )	0,011
Scarto tipo prove ripetibilità (Sr)	0,106
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)	4,987
Mediana prove ripetibilità	2,124
Mediana delle differenze (rM)	0,066
Limite ripetibilita' del metodo (r)	0,306

## Prova 7

N° prova	Valore singola prova ripetibilità		
		ri valore assoluto	Rapp. ri/rM <= 4,5
1	1,972	0,175	Accettabile
2	2,082	0,285	Accettabile
3	1,894	0,097	Accettabile
4	1,954	0,157	Accettabile
5	1,839	0,042	Accettabile
6	1,837	0,040	Accettabile
7	2,012	0,215	Accettabile
8	2,036	0,239	Accettabile
9	1,766	0,031	Accettabile
10	1,870	0,073	Accettabile
11	1,765	0,032	Accettabile
12	1,792	0,005	Accettabile
13	1,793	0,004	Accettabile
14	1,877	0,080	Accettabile
15	1,879	0,082	Accettabile
16	1,957	0,160	Accettabile
17	1,753	0,044	Accettabile
18	1,678	0,119	Accettabile
19	1,652	0,145	Accettabile
20	1,685	0,112	Accettabile
21	1,669	0,128	Accettabile
22	1,621	0,176	Accettabile
23	1,705	0,092	Accettabile
24	1,801	0,004	Accettabile
25	1,951	0,154	Accettabile
26	1,931	0,134	Accettabile
27	1,749	0,048	Accettabile
28	1,738	0,059	Accettabile
29	1,605	0,192	Accettabile
30	1,571	0,226	Accettabile

Numero prove	30,0
Valore minimo ripetibilità	1,571
Valore massimo ripetibilità	2,082
Gradi di libertà	29,0
t di Student tabulato (v=n-1; p=0,95)	2,045
Media prove ripetibilità (X)	1,814
Varianza prove ripetibilità (s <sup>2</sup> )	0,018
Scarto tipo prove ripetibilità (Sr)	0,135
Coeff.variaz. Percentuale ripetibilità (I.F.) (p=0,95)	7,454
Mediana prove ripetibilità	1,797
Mediana delle differenze (rM)	0,105
Limite ripetibilità del metodo (r)	0,391

### Test di Shapiro-Wilk

#### Prova 1

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,309	1,889	1,579	0,133

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,966
p-value	0,444
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 superiore al livello di significatività 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 44,42%

#### Prova 2

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,398	1,909	1,669	0,109

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,987
p-value	0,970
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 superiore al livello di significatività 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 97,02%

## Prova 3

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,388	1,973	1,665	0,158

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,971
p-value	0,580
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 superiore al livello di significatività 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 58,04%

## Prova 4

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,782	2,270	2,072	0,107

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,972
p-value	0,583
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 superiore al livello di significatività 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 58,35%

## Prova 5

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,566	2,071	1,794	0,148

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,934
p-value	0,064
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 superiore al livello di significatività 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 6,40%

## Prova 6

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,897	2,346	2,119	0,106

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,988
p-value	0,979
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 superiore al livello di significatività 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 97.88%

## Prova 7

Statistiche descrittive:

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,571	2,082	1,814	0,135

Test di Shapiro-Wilk (B):

W	0,980
p-value	0,825
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 superiore al livello di significatività 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 82.51%

Test di Levene per l'omogeneità delle varianze

Variabile	Osservazioni	Minimo	Massimo	Media	Deviazione std.
Prova 1	30	1,309	1,889	1,579	0,133
Prova 2	30	1,398	1,909	1,669	0,109
Prova 3	30	1,388	1,973	1,665	0,158
Prova 4	30	1,782	2,270	2,072	0,107
Prova 5	30	1,566	2,071	1,794	0,148
Prova 6	30	1,897	2,346	2,119	0,106
Prova 7	30	1,571	2,082	1,814	0,135

Test di Levene (Media) / Test bilaterale:

F (Valore osservato)	1,843
F (Valore critico)	2,143
GDL1	6
GDL2	203
p-value	0,092
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 9,24%.

Calcolo dello scarto tipo della riproducibilità (s<sub>R</sub>)

$$s_R = \sqrt{((0,018 + 0,012 + 0,025 + 0,011 + 0,022 + 0,011 + 0,018) * 30) / 210} = 0,129$$

# **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) Leroux C., Cadoré JL, Montelaro R.C. (2004) Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? Vet. Res. 35 485–512
- 4) 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
- 5) Ordinanza 18 dicembre 2007 Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi. G.U. n.14 del 17-01-2008
- 6) Ordinanza 8 agosto 2010 Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi. G.U. Serie Generale n. 219 del 18 settembre 2010
- 7) 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.
- 8) Coggins L., Norcross N.L. & Nusbaum S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. Am. J. Vet. Res., 33, 11–18.
- 9) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010, Chapter 2 . 5 . 6 .Equine infectious anaemia
- 10) Bürki F., Rossmanith W. and Rossmanith E. (1992) Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anemia Veterinary Microbiology, 33 353-360
- 11) Soutullo A. et al. (2001) Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides
- 12) Decreto Legislativo 30 dicembre 1992, n. 502 recante: "Riordino della disciplina in materia sanitaria, a norma dell'art.1 della legge 23 ottobre 1992, n. 421" G.U. 30 dicembre 1992, n. 305)
- 13) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010, Chapter 1.1.4/5. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases.
- 14) PG QUA 011 rev. 10 del 17/08/2010 "Validazione dei metodi e stima dell'incertezza di misura"

- 15) 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
- 16) Armstrong R.M.; Barnett I.T.R. (1989) An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantification of antibodies against swine vesicular disease virus (SVDV) Journal of Virological Methods 25 71-80
- 17) Signorelli C. Elementi di metodologia epidemiologica SEU, 2005

24/04/2011

Responsabile Struttura Complessa  
Direzione Operativa Diagnosi Malattie Virali e delle Leptosirosi  
Gian Luca Autorino

---