

## ORGANIZZAZIONE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO AQUA

### Virologia, sierologia e biologia molecolare per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle (AQUA IN)

Nome e indirizzo del provider e del coordinatore del "Circuito Interlaboratorio per l'Assicurazione qualità dei risultati - AQUA"	Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie Viale dell'Università 10 – 35020 LEGNARO Coordinatore Dr.ssa Maria Grimaldi Centro Servizi alla Produzione Tel. 049/8084306 e-mail: mgrimaldi@izsvenezie.it
Nome e recapiti del responsabile del circuito AQUA IN	Dr. Calogero Terregino SCS6 Virologia speciale e sperimentazione Tel. 049/8084377 e-mail: cterregino@izsvenezie.it
Nome e recapiti del responsabile tecnico e statistico AQUA IN	Responsabile tecnico (schemi IN-V e IN-S): Crispina Veggiato SCS6 Virologia speciale e sperimentazione Tel. 049/8084375 e-mail: cveggiato@izsvenezie.it  Responsabile tecnico (schema IN-M): Viviana Valastro SCS5 Ricerca e innovazione Tel. 049/8084118 e-mail: VValastro@izsvenezie.it  Responsabile statistico: Marzia Mancin Tel. 049/8084431 e-mail: mmancin@izsvenezie.it
Obiettivo e struttura del circuito	L'obiettivo del circuito AQUA IN è di offrire uno strumento per garantire l'assicurazione qualità dei risultati. Il circuito prevede schemi simultanei e continui che permettono un confronto dei laboratori tra loro a livello nazionale. Il circuito AQUA IN è composto da tre schemi qualitativi, AQUA IN-V per prove di virologia classica, AQUA IN-S per prove sierologiche e AQUA IN-M per prove di biologia molecolare.
Subappalto delle attività	Nessuna attività viene subappaltata a terzi.
Esperti tecnici esterni all'Organizzazione del circuito	Nessuno
Requisiti che permettano la partecipazione	In base allo schema prescelto, possono partecipare laboratori attrezzati per l'identificazione virale con metodi di virologia classica, metodi biomolecolari e/o metodi sierologici. Il materiale inviato è privo di infettività pertanto non sono richieste per la partecipazione livelli di biosicurezza e di biocontenimento specifici. Le attività da svolgere devono essere eseguite da personale qualificato presso

	<p>strutture abilitate a manipolare agenti biologici di classe 2 secondo la classificazione stabilita dall'All. XLVI del D. Lgs. 09/04/2008, n° 81.</p> <p>Le iscrizioni dei nuovi clienti avvengono on-line tramite il sito web dell'IZSve. L'iscrizione attribuisce al partecipante un codice alfa-numerico univoco e anonimo che consente l'accesso personalizzato (con utente e password) al gestionale Aquaweb. I clienti già iscritti, devono accedere ad Aquaweb per le successive partecipazioni.</p> <p>Con l'iscrizione al circuito AQUA il cliente accetta le condizioni generali di contratto pubblicate sul sito dell'istituto.</p>
Numero e tipologia di partecipanti attesi	<p>I partecipanti attesi sono laboratori pubblici appartenenti alla rete di sorveglianza nazionale e i laboratori privati che ne fanno richiesta.</p> <p>Considerando che gli schemi sono di tipo qualitativo non è necessario un numero minimo di partecipanti.</p>
Normativa e legislazione di riferimento	<p>Per la gestione del Circuito Interlaboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ISO/IEC 17043</li> <li>- ISO/IEC 17025</li> <li>- ISO 13528</li> </ul> <p>Per le prove di omogeneità e stabilità:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- procedure di prova di riferimento per influenza aviaria e malattia di Newcastle pubblicate sul sito IZSve del centro di referenza al seguente indirizzo <a href="https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/influenza-aviaria/procedure-prova/">https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/influenza-aviaria/procedure-prova/</a></li> </ul> <p>Per le prove accreditate secondo norma ISO/IEC 17025 si rimanda all'elenco prove pubblicato sul sito web di Accredia.</p>
Tipologie di campioni prova	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schema AQUA IN-V: antigeni emoagglutinanti ottenuti da virus dell'influenza aviaria (influenza tipo A) e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV) identificati dalle sigle V<sub>1</sub>-V<sub>n</sub>;</li> <li>- Schema AQUA IN-S: sieri policlonali contenenti anticorpi specifici dei virus influenzali di tipo A, specifici sottotipi del virus dell'influenza aviaria e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV) identificati dalle sigle S<sub>1</sub>-S<sub>n</sub>;</li> <li>- Schema AQUA IN-M: virus inattivati dell'influenza aviaria (influenza tipo A) e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV) identificati dalle sigle M<sub>1</sub>-M<sub>n</sub></li> </ul> <p>Ogni laboratorio riceve i pannelli relativi agli schemi per il quale si è iscritto.</p>
Analisi previste e calendario di pianificazione degli invii degli schemi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schema AQUA IN-V: Antigeni emoagglutinanti ottenuti da virus dell'influenza aviaria (influenza tipo A) e Paramyxovirus aviari/ virus della malattia di Newcastle (NDV) mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI);</li> <li>- Schema AQUA IN-S: Anticorpi specifici dei virus influenzali di tipo A, specifici sottotipi del virus dell'influenza aviaria e Paramyxovirus aviari/ virus della malattia di Newcastle (NDV) mediante test ELISA e/o AGID e/o test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI);</li> <li>- Schema AQUA IN-M: genoma di virus dell'influenza aviaria (influenza tipo A) e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV) mediante tecniche di RT-PCR e/o real time RT-PCR.</li> </ul> <p>Il partecipante può applicare un metodo a sua scelta per l'identificazione del misurando purché le metodiche siano incluse tra quelle previste dalla Decisione della Commissione 2006/437/CE (tecnicamente ancora valida come riferimento per le prove diagnostiche per l'influenza aviaria) e nei capitoli del Manuale Diagnostico WOA (ex OIE) sull'influenza aviaria e sulla malattia di Newcastle (rispettivamente Capitolo 3.3.4 e Capitolo 3.3.14).</p>

	<p>I metodi qualitativi applicati dai partecipanti, per ogni schema, sono da considerarsi tra loro equivalenti per la successiva fase di elaborazione statistica dei risultati.</p> <p>Verso fine anno viene predisposto e pubblicato sul sito web IZSVe un calendario con le date e le analisi previste per il circuito dell'anno successivo, ed eventuali nuovi schemi previsti.</p>
Contenuto e preparazione dei campioni prova	<p>I campioni prova sono costituiti da:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schema AQUA IN-V: Antigeni prodotti a partire da matrici virali coltivate in uova embrionate di pollo SPF e inattivate con beta-propiolattone alla diluizione 1:2000 secondo protocollo interno e poi liofilizzati.</li> <li>- Schema AQUA IN-S: Sieri prodotti previa immunizzazione di polli SPF allocati in isolatori BSL3 e inoculati con un'emulsione virale al 12% in adiuvante di Freund completo o equivalente secondo protocollo interno e liofilizzati.</li> <li>- Schema AQUA IN-M: Virus prodotti a partire da matrici virali coltivate in uova embrionate di pollo SPF e inattivati usando un terreno di trasporto commerciale.</li> </ul>
Stoccaggio e distribuzione dei campioni prova	<p>I campioni per gli schemi IN-V e IN-S sono liofilizzati e vengono sigillati nelle vials mediante tappo in gomma e ghiera in alluminio, identificati da un codice alfanumerico che identifica il campione prova da esaminare.</p> <p>I campioni per lo schema IN-M sono diluiti in un terreno di trasporto commerciale con proprietà inattivanti e conservanti per cui si trovano allo stato liquido, vengono aliquotati in provette con tappo a vite, e non necessitano di liofilizzazione.</p> <p>L'invio dei campioni prova viene eseguito a temperatura refrigerata (tra +2°C e +8°C), questa attività è gestita da IZSVe che opera attraverso corrieri specializzati in servizi logistici.</p>
Numero di distribuzioni per anno per ogni tipologia di analisi sulla stessa matrice	Una distribuzione per ciascun schema.
Numero di campioni prova per schema	Si prevede l'invio di un minimo di 10 (massimo 15) campioni prova per schema.
Informazioni tecniche specifiche	<p>Le informazioni riguardanti i campioni prova (pubblicate in Aquaweb) sono le seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- modalità di ricostituzione, conservazione e processazione dei campioni prova;</li> <li>- analisi da effettuare e metodiche da utilizzare;</li> <li>- modalità di registrazione dei risultati tramite Aquaweb;</li> <li>- date di invio dei pannelli, periodo per l'esecuzione delle prove e data ultima per l'invio dei risultati;</li> <li>- scheda di sicurezza.</li> </ul>

<p>Controlli di qualità (prove di omogeneità e stabilità) eseguiti su ogni lotto di produzione di campioni prova</p>	<p>L'omogeneità viene verificata alla fine della produzione del lotto di campioni prova ed eseguita su almeno 10 vials, scelte a random, rappresentative del lotto di produzione.</p> <p><b>Pannello IN-V</b> Viene verificato il titolo emoagglutinante (mediante test HA) e il riconoscimento dell'antigene con il siero omologo e/o l'assenza di reazioni aspecifiche mediante test HI.</p> <p><b>Pannello IN-S</b> Viene verificata la presenza di anticorpi specifici e l'assenza di reazioni aspecifiche attraverso metodica ELISA, AGID e HI utilizzando antigeni omologhi e antigeni comunemente utilizzati nella sorveglianza sierologica ufficiale.</p> <p><b>Pannello IN-M</b> Viene estratto l'RNA in singolo e vengono applicate tutte le metodiche di riferimento RT-PCR e/o real time RT-PCR per l'identificazione del genoma virale del campione, più eventuali test aggiuntivi scelti dal responsabile del circuito per escludere eventuali contaminazioni. Nonostante la ISO 17043 (punto 4.4.3.1 nota 2) preveda la non praticabilità della verifica della omogeneità in presenza di un lotto con un quantitativo limitato di materiale, sufficiente per preparare le vials delle prove valutative interlaboratorio, il provider verifica comunque l'omogeneità su un numero ristretto di vials.</p> <p>La stabilità viene verificata sui campioni prova nella loro confezione finale, nella settimana dell'invio dei pannelli e l'ultimo giorno utile dal punto di vista tecnico, considerando i tempi di esecuzione del test, prima della data di chiusura del circuito. Le modalità di analisi della stabilità sono analoghe a quelle della omogeneità, vengono testati due pannelli completi (2 vials per campione prova) per ogni schema, per istante temporale.</p>
<p>Metodi statistici utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei partecipanti</p>	<p>Per la prova di identificazione sierologica, virologica e biomolecolare, ogni partecipante analizza il set di campioni inviato (S1, S2....Sn; V1, V2....Vn; M1, M2....Mn) e fornisce un risultato di presenza/assenza di virus o anticorpi specifici (es: AIV, H5, H7 APMV1 (NDV)...), a seconda della tipologia di analisi e del misurando. I risultati dei partecipanti vengono analizzati per ottenere:</p> <p>(a) <u>Valutazione di ogni laboratorio per misurando:</u> La performance del partecipante viene valutata in termini di concordanza con il valore assegnato nei seguenti modi:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Percentuale di risposte corrette attribuendo valore 1 se l'esito trasmesso coincide con il valore assegnato e 0 altrimenti. Nel caso in cui il laboratorio non abbia analizzato uno o più campioni rispetto ad un determinato misurando (esito assente o 'Non testato'), percentuale di risposte corrette pesata per la percentuale di esiti trasmessi su quelli attesi;</li> <li>2) Statistica K di Cohen e relativa significatività per valutare la concordanza con il valore assegnato, depurata dall'effetto casuale. L'indice K di concordanza può assumere valori compresi tra -1 (massimo disaccordo) e +1 (massimo accordo). Se l'accordo osservato è uguale all'accordo atteso per effetto del caso, K assume un valore uguale a 0 (accordo nullo). Ad ogni valore di K è associata la significatività (p-value) che indica se l'accordo osservato è reale o semplicemente dovuto al caso. Per l'interpretazione dei valori del K di Cohen, si rimanda alla scala di Landis &amp; Koch (Tabella 1);</li> </ol>

3) Nel caso in cui il laboratorio non abbia analizzato uno o più campioni (esito assente o 'Non testato'), percentuale di risposte corrette attribuendo valore 1 se l'esito trasmesso dal partecipante coincide con l'esito assegnato, 0 se non ha eseguito la prova e -1 se l'esito trasmesso non corrisponde all'esito assegnato.

(b) Valutazione complessiva per misurando:

Statistica K di Fleiss (estensione della K di Cohen per  $m > 2$  partecipanti) per valutare la concordanza nella tipologia di risposta tra i laboratori che hanno eseguito la prova. Nel caso in cui uno o più laboratori non avessero trasmesso un esito per uno o più campioni del set inviato, si valuterà l'ipotesi di non considerarli nella presente valutazione. Per l'interpretazione della statistica K di Fleiss si rimanda alla scala di Landis & Koch (Tabella 1).

(c) Valutazione di ogni laboratorio per schema:

Calcolata come in (a) opzione 1 e 2 e tenendo conto dei soli misurandi per i quali il laboratorio ha trasmesso l'esito, al fine di fornire una valutazione complessiva e riepilogativa della sua performance per schema. La presente valutazione è opzionale e fornita a discrezione dell'organizzazione.

(d) Valutazione individuale e complessiva dei campioni prova:

Calcolata come in (a) punto 1 per ciascun campione rispetto ad ogni misurando e per ciascun set di campioni rispetto ad ogni misurando e ogni schema tenendo conto dei soli esiti trasmessi come Positivo e Negativo. Tale valore restituisce una misura dell'accuratezza e del grado di difficoltà riscontrato nell'analizzare i campioni.

Tabella 1. Scala di Landis & Koch.

K	Concordanza
$\leq 0$	Scarsissima
0.01-0.20	Scarsa
0.21-0.40	Discreta
0.41-0.60	Moderata
0.61-0.80	Buona
0.81-1.00	Ottima

Emissione report	<p>Dopo l'arrivo dei risultati dei partecipanti, in attesa del report definitivo, viene pubblicato in Aquaweb un report parziale che riporta il valore atteso. Il report parziale viene reso noto entro una settimana dalla data ultima prevista per l'esecuzione del circuito. Una volta pubblicato il report parziale i risultati inviati non possono più essere modificati.</p> <p>Il report definitivo contiene, oltre ai risultati di ritorno dei partecipanti, alla loro elaborazione ed alla valutazione della loro performance (espressi con tabelle e grafici), le seguenti informazioni:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Caratteristiche dei campioni inviati, metodiche utilizzate per la loro preparazione e controllo dei campioni prova;</li> <li>- Valutazione dell'omogeneità e della stabilità in termini di concordanza con il risultato atteso. I singoli risultati delle prove effettuate sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzazione;</li> <li>- I criteri di valutazione della performance dei partecipanti;</li> <li>- Commenti e raccomandazioni basati sui risultati del circuito interlaboratorio.</li> </ul> <p>I risultati trasmessi dai laboratori sono resi anonimi tramite i codici identificativi alfa-numeriche propri del laboratorio stesso.</p> <p>Il report definitivo viene pubblicato sul sito web dell'IZSVe ed in Aquaweb entro 3 mesi dalla data ultima prevista per l'esecuzione delle prove.</p> <p>In caso di performance non conformi, il partecipante può richiedere all'Organizzazione la ripetizione delle prove, entro 2 mesi dalla data di emissione del report definitivo.</p> <p>I campioni prova e la spedizione sono gratuiti per gli istituti pubblici appartenenti alla rete di sorveglianza nazionale, mentre per i laboratori privati le spese sono a carico del destinatario.</p> <p>Nel caso in cui uno schema venga distribuito e alcune prove si dimostrino successivamente non adatte per la valutazione della performance, lo stesso viene annullato e ne viene data comunicazione ai partecipanti tramite email da parte del responsabile del circuito e successiva descrizione nel report finale.</p> <p>Tutti i documenti di registrazione inerenti il circuito interlaboratorio vengono conservati per 10 anni, salvo diverse disposizioni di legge, nel qual caso prevalgono queste ultime.</p>
Comunicazione con i partecipanti	<p>I partecipanti possono comunicare con l'Organizzazione del circuito in qualsiasi momento (prima dell'inizio delle prove, in ogni fase del circuito o successivamente, per chiedere chiarimenti sulle modalità operative, per necessità legata all'esecuzione delle prove, chiarimenti sui risultati ottenuti e gestione delle non conformità) tramite e-mail o telefonicamente, anche nel caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova.</p> <p>Eventuali cambiamenti nel programma o nelle operazioni dello schema vengono immediatamente comunicate.</p> <p>I partecipanti possono appellarsi relativamente alla valutazione della loro performance entro 2 mesi dalla pubblicazione del report definitivo.</p> <p>Sono auspicabili informazioni di ritorno da parte dei partecipanti, al fine di migliorare costantemente il servizio.</p> <p>In ogni schema AQUA IN, alla pubblicazione del Report definitivo viene aperta la sezione: "CUSTOMER SATISFACTION" dove il partecipante può valutare lo schema in oggetto, cliccando lo smile verde, giallo o rosso. Il partecipante può lasciare anche le sue osservazioni e/o suggerimenti, in particolare se è stato selezionato lo smile giallo o rosso.</p> <p>I dati di customer satisfaction raccolti sono trattati ed utilizzati dall'IZSVe, organizzatore del circuito interlaboratorio AQUA, nel rispetto della riservatezza e della privacy, secondo quanto previsto dal Regolamento UE 2016/679, allo scopo di migliorare continuamente il servizio offerto.</p> <p>I dati di customer satisfaction inviati non sono anonimi allo scopo di poter dialogare direttamente con i laboratori, in base ai commenti, suggerimenti o critiche espressi nel campo testuale della sezione, relativa ad ogni schema AQUA IN.</p>

	<p>Entro due mesi dalla data di emissione del report, i dati di customer satisfaction raccolti verranno valutati, per poter operare tempestivamente azioni correttive e/o di miglioramento.</p> <p>Le valutazioni degli schemi possono peraltro essere inserite anche dopo i due mesi. In tale caso la valutazione dei dati di customer satisfaction avviene in fase di riesame annuale della Direzione che viene svolto i primi mesi dell'anno successivo.</p>
--	---