

PROFICIENCY TESTING AQUA IN

Virologia, sierologia e biologia molecolare per l'influenza
aviaria e la malattia di Newcastle

Report	Finale
Schema	AQUA IN-M AQUA IN-V AQUA IN-S
Anno di erogazione	2025
Round	1-25
Periodo di esecuzione	03/03/2025 – 18/04/2025
Data emissione	10/06/2025
ID report	AQIN-25R01F-003

ORGANIZZATORE	Centro di Riferenza Nazionale (CRN) per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) Viale dell'Università 10 Legnaro (Padova) - Italia www.izsvenezie.it
RESPONSABILE PT	Calogero Terregino, DVM, PhD cterregino@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084377
RESPONSABILE TECNICO	Crispina Veggiano (AQUA IN-V, AQUA IN-S) cveggiano@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084375 Viviana Valastro, PhD (AQUA IN-M) vvalastro@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084118
RESPONSABILE STATISTICO	Marzia Mancin, MSc mmancin@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084431
SEGRETERIA	Paola Mozzi aqua-vs@izsvenezie.it ; pmozzi@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084369-371

Riservatezza

Nel presente documento i risultati di ogni laboratorio partecipante sono identificati da un codice alfanumerico che è stato assegnato a ciascuno di essi al momento della registrazione e che consente di riportare i risultati senza rivelare l'identità dei partecipanti.

Tutti gli operatori dell'Organizzazione del PT sono tenuti alla riservatezza sia relativamente all'identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

Layout report: IZS MOD 501 IN – rev 07 – 04/25 - Report AQUA IN

Come citare il documento:

Valastro Viviana & Terregino Calogero (2025). Proficiency Testing AQUA IN: Virologia, sierologia e biologia molecolare per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle, Report Finale AQIN-25R01F-003. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Riferenza Nazionale (CRN) per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Legnaro (PD), Italia

Sommario

Introduzione	5
1. Materiali e Metodi	5
1.1 Proprietà e composizione dei campioni	5
1.1.1 Schema IN-M	5
1.1.2 Schema IN-V	5
1.1.3 Schema IN-S	6
1.2 Valore assegnato	6
1.3 Controllo qualità	6
1.4 Distribuzione	6
1.5 Analisi dei campioni	6
1.6 Comunicazione dei risultati	6
1.7 Valutazione dei risultati	6
2. Risultati	14
2.1 Schema IN-M	14
2.2 Schema IN-V	27
2.3 Schema IN-S	31
3. Discussioni	40
3.1 Schema IN-M	40
3.2 Schema IN-V	40
3.3 Schema IN-S	40
4. Conclusioni	43
Ringraziamenti	43
Bibliografia	44
APPENDICE I – DATI OPZIONALI	45
Schema AQUA IN-M	46
Schema AQUA IN-V	57
Schema AQUA IN-S	59

Abbreviazioni

AGID	Agar Gel Immuno-Diffusione
BSL3	Laboratorio di Biosicurezza livello 3
CNR	Centro di Referenza Nazionale
Ct	Cycle threshold – Ciclo soglia
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GC	Genomic Copies – Copie genomiche
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
LPAI	Low Pathogenic Avian Influenza
PT	Proficiency Testing
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SPF	Specific Pathogen Free

Introduzione

Il Centro di Referenza Nazionale (CRN) per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, ospitato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ha organizzato il PT AQUA IN "Virologia, Sierologia e Biologia molecolare per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle" per i laboratori ufficiali del territorio nazionale in linea con il Regolamento (UE) 2017/625. La partecipazione era estesa anche ad altri laboratori la cui adesione era su base volontaria. L'obiettivo del programma era quello di valutare e migliorare, se necessario, la capacità dei laboratori partecipanti di diagnosticare le infezioni da virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIVS) e orthoavulavirus javaense (APMV-1) inclusi i virus responsabili della malattia di Newcastle.

Il programma consisteva di tre schemi qualitativi erogati simultaneamente e progettati per le seguenti rilevazioni:

- IN-M 1-25 "Identificazione del genoma di virus dell'influenza aviaria (influenza tipo A) e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV)";
- IN-V 1-25 "Identificazione di antigeni emoagglutinanti ottenuti da virus dell'influenza aviaria (influenza tipo A) e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV)";
- IN-S 1-25 "Identificazione di anticorpi specifici dei virus influenzali di tipo A, specifici sottotipi del virus dell'influenza aviaria e Paramyxovirus aviari/virus della malattia di Newcastle (NDV)".

I partecipanti sono stati invitati a fornire un'interpretazione qualitativa dei risultati e sono stati informati del fatto che qualsiasi valore quantitativo trasmesso (Ct e/o titoli HA/HI) sarebbe stato utilizzato solo per fornire loro un feedback sulle prestazioni dei test applicati.

Ventiquattro (24) laboratori hanno aderito all'edizione 2025 del PT, tra cui ventuno (21) appartenenti ad Istituti Zooprofilattici Sperimentali (II.ZZ.SS.) e tre (3) ad enti privati. I campioni sono stati tutti spediti il 24 febbraio per garantire che tutti i partecipanti ricevessero i campioni in tempo per iniziare l'esercizio. Nessuna anomalia rispetto a contenuto e condizione dei campioni è stata segnalata dai partecipanti.

L'esercizio si è svolto dal 3 marzo al 18 aprile 2025, data di scadenza per la presentazione dei risultati. Tutti i laboratori hanno rispettato il termine stabilito.

In data 28 aprile è stato pubblicato in AQUAWEB il report preliminare contenente la composizione dei campioni e i valori assegnati.

Il presente report mostra i risultati che sono stati classificati come corretti o non corretti in base ai valori assegnati dal Laboratorio organizzatore. Per misurare le prestazioni dei laboratori partecipanti sono stati utilizzati il K-Cohen e il relativo valore di significatività.

1. Materiali e Metodi

1.1 Proprietà e composizione dei campioni

Quando possibile, i campioni rispecchiavano la natura dei campioni di routine.

1.1.1 Schema IN-M

Il materiale da analizzare consisteva di isolati virali derivati dalla propagazione di ceppi selezionati di AI e APMV-1 nella cavità allantoidea di uova di pollo embrionate SPF di 9-11 giorni. In caso di campioni negativi, è stato utilizzato il liquido allantoideo di uova di pollo SPF non infette. I campioni sono stati spediti in un terreno commerciale a base di guanidinio tiocianato, che garantisce l'inattivazione del virus e la stabilizzazione dell'RNA virale, ed erano pronti per essere processati mediante estrazione degli acidi nucleici. Il pannello era composto da tredici (13) campioni da 1 ml ciascuno, tra cui otto (8) isolati di influenza aviaria, tre (3) APMV-1 e due (2) campioni negativi. La composizione completa del pannello e i valori assegnati sono riportati nella Tabella 1.

1.1.2 Schema IN-V

Il materiale da analizzare consisteva di antigeni inattivati chimicamente con lo 0,05% di β -propiolattone e ottenuti dalla propagazione di ceppi virali AI e APMV nella cavità allantoidea di uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni. In caso di campioni negativi, è stato utilizzato il liquido allantoideo di uova di pollo SPF non infette. I campioni sono stati distribuiti in forma liofila e dovevano essere ricostituiti in 1 ml di acqua distillata immediatamente prima del test. Il pannello era composto da dodici (12) campioni, tra cui sei (6) isolati di

influenza aviaria, tre (3) APMV-1 e tre (3) campioni negativi. La composizione completa del pannello e i valori assegnati sono riportati nella Tabella 2.

1.1.3 Schema IN-S

Il materiale da analizzare consisteva di siero ottenuto dopo l'immunizzazione di polli SPF stabulati in condizioni di BSL3 con liquido allantoideo contenente ceppi virali selezionati di AI o APMV mescolato con adiuvante di Freund al 12% o equivalente. In caso di campioni negativi, è stato utilizzato siero di pollo SPF non immunizzato. I campioni sono stati forniti in forma liofila e dovevano essere ricostituiti in 1 ml di acqua distillata immediatamente prima del test. Il pannello era composto da dodici (12) campioni, di cui sette (7) contenenti anticorpi contro virus dell'influenza di tipo A, tre (3) contenenti anticorpi contro APMV-1 e due (2) campioni negativi. La composizione completa del pannello e i valori assegnati sono riportati nella Tabella 3.

1.2 Valore assegnato

Il valore assegnato coincide con il valore atteso che è stato determinato utilizzando procedure analitiche raccomandate che garantiscono l'accuratezza e la precisione dei risultati. Questi metodi sono elencati nella Tabella 4 e sono disponibili sul sito web dell'IZSVe.

1.3 Controllo qualità

Il controllo qualità è stato eseguito in conformità alle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 e UNI ISO 13528:2022, utilizzando i metodi contrassegnati dal simbolo † in Tabella 4. Ciascun lotto di campioni è stato sottoposto a test di omogeneità dopo la produzione e di stabilità all'inizio e al termine dell'esercizio.

I test hanno dimostrato che tutti i campioni di questa edizione possedevano un naturale grado di omogeneità e avevano mantenuto un'adeguata stabilità durante il periodo dell'esercizio.

I risultati delle prove di omogeneità e stabilità sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzatore.

1.4 Distribuzione

I campioni sono stati adeguatamente imballati e spediti in condizioni tali da mantenere la stabilità del materiale in essi contenuto durante il trasporto. I campioni sono stati identificati con un codice alfanumerico e dovevano essere utilizzati solo per gli scopi del PT.

1.5 Analisi dei campioni

I partecipanti sono stati invitati a testare i campioni utilizzando i metodi analitici in uso routinariamente presso i loro laboratori, purché conformi a quelli definiti dal CRN e ad applicare i criteri di analisi riportati nella Tabella 5, Tabella 6 e Tabella 7. I partecipanti sono stati inoltre informati che qualsiasi risultato aggiuntivo sarebbe stato utilizzato solo per fornire informazioni aggiuntive sulle performance dei test applicati utili ai fini dell'autovalutazione. Tali dati sono presentati sotto forma di appendice al presente report (APPENDICE I).

1.6 Comunicazione dei risultati

I risultati sono stati trasmessi attraverso il portale AQUAWEB e secondo le espressioni di risultato specificate nella Tabella 5, Tabella 6 e Tabella 7. Ai partecipanti è stato raccomandato di fornire anche i dati quantitativi, nonché dettagli sui protocolli utilizzati che sarebbero stati trattati solo a titolo informativo ed elaborati al solo scopo di fornire ai laboratori un feedback sulle prestazioni dei propri saggi. Per essere conformi, i risultati dovevano essere consegnati entro il termine stabilito.

1.7 Valutazione dei risultati

L'analisi statistica dei risultati qualitativi è stata eseguita in conformità alla norma UNI ISO 13528:2022 e in base al numero di risultati "corretti", ossia di risposte corrispondenti ai valori assegnati.

L'accuratezza tra i risultati e i valori assegnati è stata calcolata per laboratorio e per campione rispetto a ciascun misurando. Il valore di accuratezza è stato determinato anche per misurare le prestazioni complessive raggiunte per ogni misurando e la percentuale di campioni positivi (sensibilità) e negativi (specificità) correttamente identificati (Tabella 10, Tabella 15 e Tabella 19). I metodi applicati per lo stesso misurando sono stati considerati equivalenti per l'elaborazione statistica dei risultati se conformi a quelli stabiliti dall'Organizzazione (Tabella 5, Tabella 6 e Tabella 7).

Inoltre, la statistica kappa (k) è stata usata per tenere conto dell'accordo dovuto al caso nella stima statistica dell'affidabilità inter-rater esistente tra ciascun laboratorio e l'Organizzazione (kappa di Cohen), nonché tra tutti i partecipanti (kappa di Fleiss). Il valore del coefficiente k può variare tra -1 e 1; $k = 1$ implica un perfetto accordo, mentre $k = -1$ implica un perfetto disaccordo. Se non c'è accordo tra le risposte, se non quello dovuto al caso, allora $k = 0$. L'interpretazione e la significatività statistica del coefficiente sono date rispettivamente dalla scala di Landis & Koch (Tabella 8) e dal p -value. Un valore di $p \geq 0,05$ è indicativo di accordo dovuto al caso,

I criteri basati sul k di Cohen e il relativo p -value sono stati utilizzati per la valutazione finale delle competenze analitiche dei partecipanti Tabella 9. Per essere valutato come "Accettabile", il laboratorio avrebbe dovuto ottenere $0.90 \leq k \leq 1.00$ con $p < 0.05$. Diversamente, la valutazione sarebbe stata "Discutibile" o "Inaccettabile" in base al valore di k . Il risultato indicato come "Non testato" o non fornito è stato considerato non corretto quando non aderente ai criteri di analisi.

Tabella 1. Pannello dello schema IN-M – Descrizione e valori assegnati.

ID Campione	Ceppo	Tipo	Patotipo	Lineaggio/Clade/Genotipo	Esito atteso			
					AIV	AIV H5	AIV H7	APMV-1
M01	A/chicken/South Africa/SA2310_23VIR11588-2/2023	H7N6	HPAI	Eurasian	P	N	P	N
M02	A/European herring gull/Norway/2023-07-2935_23VIR9749-12/2023	H5N5	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	P	P	N	N
M03	Negativo				N	N	N	N
M04	A/guinea fowl/Nigeria/KN-GF-14-16C_23VIR1455-1/2022	H5N1	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	P	P	N	N
M05	AOAV-1/Gallus gallus/Belgium/8744/2022	APMV-1	Avirulento	I.1.1*	N	N	N	P
M06	A/teal/Italy/1856-7_22VIR4622-12/2021	H9N2	LPAI	Clade Y8**	P	N	N	N
M07	A/chicken/Netherlands/24001946-006010_24VIR4103-5/2024	H5N1	LPAI	Eurasian	P	P	N	N
M08	A/chicken/Netherlands/23025569-021_24VIR4103-4/2023	H7N3	LPAI	Eurasian	P	N	P	N
M09	PPMV-1/dove/Italy/24VIR145-4/2024	APMV-1	Virulento	XXI.2*	N	N	N	P
M10	A/European herring gull/Italy/24VIR9146-12/2024	H5N1	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	P	P	N	N
M11	A/chicken/Niger/13-23_23VIR3551-49/2023	H9N2	LPAI	Clade G5.5**	P	N	N	N
M12	Negativo				N	N	N	N
M13	AAvV-1/chicken/Macedonia/1400-1_20VIR1984-5/2020	APMV-1	Virulento	VII.2*	N	N	N	P

Le abbreviazioni sono usate come P = Positivo, N = Negativo, AIV = Virus dell'influenza aviaria, APMV-1 = Paramyxovirus aviare di tipo 1, HPAI = Virus dell'influenza aviare ad alta patogenicità, LPAI = Virus dell'influenza aviare a bassa patogenicità

* Secondo la nomenclatura aggiornata dei virus della malattia di Newcastle (Dimitrov et al., 2019; <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103917>)

** Secondo la nomenclatura dei virus influenzali di sottotipo H9 (Fusaro et al., 2024)

Tabella 2. Pannello dello schema IN-V – Descrizione e valori assegnati.

ID Campione	Ceppo	Tipo	Patotipo	Lineaggio/Clade/Genotipo	Titolo [a]	Esito atteso		
						AIV H5	AIV H7	APMV-1
V01	A/chicken/Netherlands/23025569-021_24VIR4103-4/2023	H7N3	LPAI	Eurasian	1:128	N	P	N
V02	A/chicken/Netherlands/24001946-006010_24VIR4103-5/2024	H5N1	LPAI	Eurasian	1:256	P	N	N
V03	APMV-1/chicken/Vushtrri-Kosovo/94_21VIR5162-29/2021	APMV-1	Virulento	VII.2*	1:256	N	N	P
V04	A/duck/Italy/21VIR8024-20/2021	H5N3	LPAI	Eurasian	1:128	P	N	N
V05	A/teal/Italy/1856-7_22VIR4622-12/2021	H9N2	LPAI	Clade Y8**	1:256	N	N	N
V06	A/European herring gull/Norway/2023-07-2935_23VIR9749-12/2023	H5N5	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	1:128	P	N	N
V07	NDV La Sota	APMV-1	Avirulento	II*	1:256	N	N	P
V08	Negativo					N	N	N
V09	A/chicken/South Africa/SA2310_23VIR11588-2/2023	H7N6	HPAI	Eurasian	1:256	N	P	N
V10	Negativo					N	N	N
V11	Negativo					N	N	N
V12	NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9.1_20VIR6516/19	APMV-1	Virulento	VII.1.1*	1:64	N	N	P

Le abbreviazioni sono usate come P = Positivo, N = Negativo, AIV = Virus dell'influenza aviaria, APMV-1 = Paramyxovirus aviare di tipo 1, HPAI = Virus dell'influenza aviare ad alta patogenicità, LPAI = Virus dell'influenza aviare a bassa patogenicità

[a] Valore della moda dei titoli emoagglutinanti (HA) ottenuti durante i test di valutazione della qualità dei campioni e individuato come la più alta diluizione di antigene che provoca la completa agglutinazione degli eritrociti

* Secondo la nomenclatura aggiornata dei virus della malattia di Newcastle (Dimitrov et al., 2019; <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103917>)

** Secondo la nomenclatura dei virus influenzali di sottotipo H9 (Fusaro et al., 2024)

Tabella 3. Pannello dello schema IN-S – Descrizione e valori assegnati.

ID Campione	Antigene immunizzante				Titolo [a]	Esito Atteso			
	Ceppo	Tipo	Patotipo	Lineaggio/Clade/Genotipo		AIV	AIV H5	AIV H7	APMV-1
S01	A/chicken/South Africa/SA2310_23VIR11588-2/2023	H7N6	HPAI	Eurasian	1:1024	P	N	P	N
S02	A/pheasant/Italy/21VIR2284-22/2021	H9N2	LPAI	Clade Y8**	1:1024	P	N	N	N
S03	Negativo					N	N	N	N
S04	A/turkey/Italy/17VIR9106-38/2017	H5N8	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	1:256	P	P	N	N
S05§	APMV-1/chicken/Bulgaria/09-02_19VIR1262-2/2019	APMV-1	Virulento	VII.2*	1:4096	N	N	N	P
S06§	A/turkey/Italy/21VIR9520-3/2021	H5N1	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	1:512	P	P	N	N
S07	Negativo					N	N	N	N
S08	A/pheasant/Italy/22VIR1741-97/2022	H5N2	LPAI	Eurasian	1:512	P	P	N	N
S09	APMV-1/pigeon/Cyprus/20VIR3543-30/2020	APMV-1	Virulento	XXI.2*	1:256	N	N	N	P
S10	A/chicken/Netherlands/23025569-021_24VIR4103-4/2023	H7N3	LPAI	Eurasian	1:256	P	N	P	N
S11§	A/turkey/Italy/21VIR9520-3/2021	H5N1	HPAI	Eurasian, clade 2.3.4.4b	1:64	P	P	N	N
S12§	APMV-1/chicken/Bulgaria/09-02_19VIR1262-2/2019	APMV-1	Virulento	VII.2*	1:128	N	N	N	P

Le abbreviazioni sono usate come P = Positivo, N = Negativo, AIV = Virus dell'influenza aviaria, APMV-1 = Paramyxovirus aviare di tipo 1, HPAI = Virus dell'influenza aviare ad alta patogenicità, LPAI = Virus dell'influenza aviare a bassa patogenicità

[a] Valore della moda dei titoli anticorpali ottenuti durante i test HI di valutazione della qualità dei campioni e individuati come la più alta diluizione di siero che provoca la completa inibizione dell'attività emoagglutinante dell'antigene omologo

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

* Secondo la nomenclatura aggiornata dei virus della malattia di Newcastle (Dimitrov et al., 2019; <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103917>)

** Secondo la nomenclatura dei virus influenzali di sottotipo H9 (Fusaro et al., 2024)

Tabella 4. Metodi usati per assegnare i valori target ai campioni e la conformità alle prove di omogeneità e stabilità (identificati dal simbolo †).

Schema	Misurando	Metodo [^]
AQUA IN-M	Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)	PDP VIR 018†
	Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5	PDP VIR 143, PDP VIR 125
	Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7	PDP VIR 144, PDP VIR 126
	Paramyxovirus aviario di tipo 1	PDP VIR 151†, PDP VIR 1002
AQUA IN-V	Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H5	PDP VIR 005†
	Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H7	PDP VIR 005†
	Paramyxovirus aviario di tipo 1	PDP VIR 007†
AQUA IN-S	Anticorpi contro il virus dell'influenza aviaria di tipo A	PDP IMM 063†, PDP IMM 116†*
	Anticorpi contro il sottotipo H5 del virus dell'influenza aviaria	PDP IMM 064†
	Anticorpi contro il sottotipo H7 del virus dell'influenza aviaria	PDP IMM 064†
	Anticorpi contro il paramyxovirus aviario di tipo 1	PDP IMM 065†

[^] PDP di riferimento per influenza aviaria e malattia di Newcastle pubblicate sul sito IZSVE del Centro di Referenza Nazionale al seguente indirizzo <https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/influenza-aviaria/procedure-prova/>

† Metodo applicato per la verifica del grado di omogeneità e stabilità dei campioni, nonché del valore assegnato

* Metodo non disponibile sul sito web dell'IZSVE. Sono state applicate le istruzioni del produttore del kit in uso

Tabella 5. Misurandi, metodi, espressioni di risultato e criteri di analisi dello schema IN-M.

Misurando	Metodo	Espressione di risultato	Criterio di analisi [^]
Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)	Real-time e/o RT-PCR convenzionale	Positivo o Negativo o Non testato	13 su 13 campioni
Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5	Real-time e/o RT-PCR convenzionale	Positivo o Negativo o Non testato	13 su 13 campioni**
Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7	Real-time e/o RT-PCR convenzionale	Positivo o Negativo o Non testato	13 su 13 campioni**
Paramyxovirus aviario di tipo 1	Real-time e/o RT-PCR convenzionale	Positivo o Negativo o Non testato	13 su 13 campioni

[^] Numero di campioni correttamente determinati per ricevere 100% di risultati corretti

** Per qualsiasi campione risultato negativo al test di screening per AIV (gene M/NP), il risultato indicato come "Non testato" o non fornito è accettato e trattato come corretto

Tabella 6. Misurandi, metodi, espressioni di risultato e criteri di analisi dello schema IN-V.

Misurando	Metodo	Espressione di risultato	Criterio di analisi [^]
Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H5	Test di emoagglutinazione (HA) e inibizione dell'emoagglutinazione (HI)	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni
Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H7	Test di emoagglutinazione (HA) e inibizione dell'emoagglutinazione (HI)	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni
Paramyxovirus aviario di tipo 1	Test di emoagglutinazione (HA) e inibizione dell'emoagglutinazione (HI)	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni

[^] Numero di campioni correttamente determinati per ricevere 100% di risultati corretti

Tabella 7. Misurandi, metodi, espressioni di risultato e criteri di analisi dello schema IN-S.

Misurando	Metodo	Espressione di risultato	Criterio di analisi [^]
Anticorpi contro il virus dell'influenza aviaria di tipo A	ELISA e/o AGID	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni
Anticorpi contro il sottotipo H5 del virus dell'influenza aviaria	Test d'inibizione dell'emoagglutinazione (HI)	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni
Anticorpi contro il sottotipo H7 del virus dell'influenza aviaria	Test d'inibizione dell'emoagglutinazione (HI)	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni
Anticorpi contro il paramyxovirus aviario di tipo 1	Test d'inibizione dell'emoagglutinazione (HI)	Positivo o Negativo o Non testato	12 su 12 campioni

[^] Numero di campioni correttamente determinati per ricevere 100% di risultati corretti

Tabella 8. Scala di Landis & Koch.

K	Concordanza
≤ 0	Assente
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

Tabella 9. Criteri per la valutazione delle performance.

Valutazione	Interpretazione
Accettabile ($0.90 \leq K \leq 1.00$; $p < 0.05$)	Accordo perfetto o quasi perfetto con i valori assegnati.
Discutibile ($0.60 \leq K \leq 0.89$; $p < 0.05$)	L'accordo è considerato affidabile – Accordo parziale con i valori assegnati. Il campione erroneamente identificato dovrebbe essere ritestato con risultati accettabili. Eccezione. Nessuna incongruenza con i valori target ma accordo parziale con il numero di risultati attesi. Le azioni successive devono essere determinate in accordo al sistema qualità del laboratorio o le disposizioni dell'ente di accreditamento.
Non accettabile ($K \leq 0.59$ o $p \geq 0.05$)	Scarso accordo o accordo dovuto al caso – Il campione identificato in modo errato dovrebbe essere ritestato ed è raccomandata la revisione del metodo e della procedura impiegati. Eccezione. Nessuna incongruenza con i valori target ma accordo parziale con il numero di risultati attesi. Le azioni successive devono essere determinate in accordo al sistema qualità del laboratorio o le disposizioni dell'ente di accreditamento.

2. Risultati

2.1 Schema IN-M

I risultati per lo schema IN-M sono stati presentati da ventuno (21) laboratori, e più precisamente da diciotto (18) I.I.ZZ.SS. e tre (3) laboratori privati.

La Tabella 10 riassume le prestazioni complessive differenziate per misurando, mentre i risultati dei singoli laboratori e i relativi punteggi sono riportati nelle Tabelle da 11 a 14. Dati informativi e/o risultati aggiuntivi sono riportati nell'APPENDICE I.

Tabella 10. Analisi delle performance complessive per lo schema IN-M.

Misurando	No.*	Accuratezza (%)	k	p-value	Se (%)	Sp (%)
Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)	21	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00
Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5	14	99,45	0,97	0,00	98,21	100,00
Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7	14	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00
Paramyxovirus aviario di tipo 1/NDV	13	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00

Se = Sensibilità; Sp = Specificità

* Numero di laboratori che hanno rispettato i criteri di analisi dei campioni

Tabella 11. Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000348	L000356	L000358	L000390	L000399	L000411	L000438	L000452	L000455	
M01	H7N6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M02	H5N5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M03	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M04	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M05	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M06	H9N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M07	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M08	H7N3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M09	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M10	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M11	H9N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M12	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M13	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 11 (continuazione). Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000469	L000503	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	
M01	H7N6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M02	H5N5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M03	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M04	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M05	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M06	H9N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M07	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M08	H7N3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M09	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M10	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M11	H9N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M12	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M13	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 11 (continuazione). Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)'.

Campione		Codice Laboratorio	Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000685	
M01	H7N6	P	100,00
M02	H5N5	P	100,00
M03	Negativo	N	100,00
M04	H5N1	P	100,00
M05	APMV-1	N	100,00
M06	H9N2	P	100,00
M07	H5N1	P	100,00
M08	H7N3	P	100,00
M09	APMV-1	N	100,00
M10	H5N1	P	100,00
M11	H9N2	P	100,00
M12	Negativo	N	100,00
M13	APMV-1	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	
Kappa		1,00	
p-value		0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo
 In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi
 Complessivamente, il pannello comprendeva otto (8) AIV positivi e cinque (5) AIV negativi

Tabella 12. Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000348	L000356	L000358	L000390	L000399	L000411	L000438	L000452	L000455	
M01	H7N6	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M02	H5N5	P	NT	NT	NT	NT	P	NT	P	P	NT	100,00
M03*	Negativo	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M04	H5N1	P	NT	NT	NT	NT	P	NT	P	P	NT	100,00
M05*	APMV-1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M06	H9N2	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M07	H5N1	P	NT	NT	NT	NT	P	NT	P	P	NT	92,86
M08	H7N3	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M09*	APMV-1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M10	H5N1	P	NT	NT	NT	NT	P	NT	P	P	NT	100,00
M11	H9N2	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M12*	Negativo	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M13*	APMV-1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
Accuratezza (%)		100,00					100,00		100,00	100,00		
Kappa		1,00					1,00		1,00	1,00		
p-value		0,00					0,00		0,00	0,00		

Tabella 12 (continuazione). Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000469	L000503	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	
M01	H7N6	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M02	H5N5	P	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M03*	Negativo	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M04	H5N1	P	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M05*	APMV-1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M06	H9N2	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M07	H5N1	P	NT	P	P	P	P	P	N	P	P	92,86
M08	H7N3	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M09*	APMV-1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M10	H5N1	P	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M11	H9N2	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M12*	Negativo	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M13*	APMV-1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	92,31	100,00	100,00	
Kappa		1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,81	1,00	1,00	
p-value		0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 12 (continuazione). Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5'.

Campione		Codice Laboratorio	Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000685	
M01	H7N6	N	100,00
M02	H5N5	P	100,00
M03*	Negativo	N	100,00
M04	H5N1	P	100,00
M05*	APMV-1	N	100,00
M06	H9N2	N	100,00
M07	H5N1	P	92,86
M08	H7N3	N	100,00
M09*	APMV-1	N	100,00
M10	H5N1	P	100,00
M11	H9N2	N	100,00
M12*	Negativo	N	100,00
M13*	APMV-1	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	
Kappa		1,00	
p-value		0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo, NT = Non testato
In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

* Il risultato "Non testato" o non fornito è accettato e trattato come "Negativo" per la valutazione dei risultati
Complessivamente, il pannello comprendeva quattro (4) AIV-H5Nx positivi e nove (9) AIV-H5Nx negativi

Tabella 13. Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000348	L000356	L000358	L000390	L000399	L000411	L000438	L000452	L000455	
M01	H7N6	P	NT	NT	NT	NT	P	NT	P	P	NT	100,00
M02	H5N5	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M03*	Negativo	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M04	H5N1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M05*	APMV-1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M06	H9N2	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M07	H5N1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M08	H7N3	P	NT	NT	NT	NT	P	NT	P	P	NT	100,00
M09*	APMV-1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M10	H5N1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M11	H9N2	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M12*	Negativo	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
M13*	APMV-1	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	100,00
Accuratezza (%)		100,00					100,00		100,00	100,00		
Kappa		1,00					1,00		1,00	1,00		
p-value		0,00					0,00		0,00	0,00		

Tabella 13 (continuazione). Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000469	L000503	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	
M01	H7N6	P	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M02	H5N5	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M03*	Negativo	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M04	H5N1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M05*	APMV-1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M06	H9N2	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M07	H5N1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M08	H7N3	P	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
M09*	APMV-1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M10	H5N1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M11	H9N2	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M12*	Negativo	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
M13*	APMV-1	N	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 13 (continuazione). Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7'.

Campione		Codice Laboratorio	Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000685	
M01	H7N6	P	100,00
M02	H5N5	N	100,00
M03*	Negativo	N	100,00
M04	H5N1	N	100,00
M05*	APMV-1	N	100,00
M06	H9N2	N	100,00
M07	H5N1	N	100,00
M08	H7N3	P	100,00
M09*	APMV-1	N	100,00
M10	H5N1	N	100,00
M11	H9N2	N	100,00
M12*	Negativo	N	100,00
M13*	APMV-1	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	
Kappa		1,00	
p-value		0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo, NT = Non testato
In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

* Il risultato "Non testato" o non fornito è accettato e trattato come "Negativo" per la valutazione dei risultati
Complessivamente, il pannello comprendeva due (2) AIV-H7Nx positivo e undici (11) AIV-H7Nx negativi

Tabella 14. Risultati per il misurando 'Paramyxovirus aviario di tipo 1'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000348	L000356	L000358	L000390	L000399	L000411	L000438	L000452	L000455	
M01	H7N6	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M02	H5N5	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M03	Negativo	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M04	H5N1	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M05	APMV-1	NT	NT	NT	NT	NT	P	P	P	P	NT	100,00
M06	H9N2	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M07	H5N1	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M08	H7N3	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M09	APMV-1	NT	NT	NT	NT	NT	P	P	P	P	NT	100,00
M10	H5N1	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M11	H9N2	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M12	Negativo	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	N	N	NT	100,00
M13	APMV-1	NT	NT	NT	NT	NT	P	P	P	P	NT	100,00
Accuratezza (%)							100,00	100,00	100,00	100,00		
Kappa							1,00	1,00	1,00	1,00		
p-value							0,00	0,00	0,00	0,00		

Tabella 14 (continuazione). Risultati per il misurando 'Paramyxovirus aviario di tipo 1'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000469	L000503	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	
M01	H7N6	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M02	H5N5	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M03	Negativo	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M04	H5N1	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M05	APMV-1	P	NT	P	P	P	P	P	P	NT	P	100,00
M06	H9N2	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M07	H5N1	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M08	H7N3	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M09	APMV-1	P	NT	P	P	P	P	P	P	NT	P	100,00
M10	H5N1	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M11	H9N2	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M12	Negativo	N	NT	N	N	N	N	N	N	NT	N	100,00
M13	APMV-1	P	NT	P	P	P	P	P	P	NT	P	100,00
Accuratezza (%)		100,00		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00		100,00	
Kappa		1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	
p-value		0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	

Tabella 14 (continuazione). Risultati per il misurando 'Paramyxovirus aviario di tipo 1'.

Campione		Codice Laboratorio	Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000685	
M01	H7N6	N	100,00
M02	H5N5	N	100,00
M03	Negativo	N	100,00
M04	H5N1	N	100,00
M05	APMV-1	P	100,00
M06	H9N2	N	100,00
M07	H5N1	N	100,00
M08	H7N3	N	100,00
M09	APMV-1	P	100,00
M10	H5N1	N	100,00
M11	H9N2	N	100,00
M12	Negativo	N	100,00
M13	APMV-1	P	100,00
Accuratezza (%)		100,00	
Kappa		1,00	
p-value		0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo, NT = Non testato
 In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi
 Complessivamente, il pannello comprendeva tre (3) APMV-1 positivi e dieci (10) APMV-1 negativi

2.2 Schema IN-V

I risultati per lo schema IN-V sono stati presentati da nove (9) laboratori appartenenti agli II.ZZ.SS..

La Tabella 15 riassume le prestazioni complessive differenziate per misurando, mentre i risultati dei singoli laboratori e i relativi punteggi sono riportati nelle Tabelle da 16 a 18. Dati informativi e risultati aggiuntivi sono riportati nell'APPENDICE I.

Tabella 15. Analisi delle performance complessive per lo schema IN-V.

Misurando	No.*	Accuratezza (%)	k	p-value	Se (%)	Sp (%)
Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H5	9	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00
Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H7	9	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00
Paramyxovirus aviario di tipo 1/NDV	9	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00

Se = Sensibilità; Sp = Specificità

* Numero di laboratori che hanno rispettato i criteri di analisi dei campioni

Tabella 16. Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H5'.

Campione		Codice Laboratorio									Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000399	L000438	L000469	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000637	
V01	H7N3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V02	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V03	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V04	H5N3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V05	H9N2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V06	H5N5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V07	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V08*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V09	H7N6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V10*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V11*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V12	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo

In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

* Il risultato "Non testato" o non fornito è accettato e trattato come "Negativo" per la valutazione dei risultati

Complessivamente, il pannello comprendeva tre (3) AIV-H5Nx positivi e nove (9) AIV-H5Nx negativi

Tabella 17. Risultati per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria di sottotipo H7'.

Campione		Codice Laboratorio									Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000399	L000438	L000469	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000637	
V01	H7N3	P	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V02	H5N1	N	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V03	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V04	H5N3	N	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V05	H9N2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V06	H5N5	N	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V07	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V08*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V09	H7N6	P	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V10*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V11*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V12	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo

In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

* Il risultato "Non testato" o non fornito è accettato e trattato come "Negativo" per la valutazione dei risultati

Complessivamente, il pannello comprendeva due (2) AIV-H7Nx positivi e dieci (10) AIV-H7Nx negativi

Tabella 18. Risultati per il misurando 'Paramyxovirus aviario di tipo 1'.

Campione		Codice Laboratorio									Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000399	L000438	L000469	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000637	
V01	H7N3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V02	H5N1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V03	APMV-1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V04	H5N3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V05	H9N2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V06	H5N5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V07	APMV-1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
V08*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V09	H7N6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V10*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V11*	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
V12	APMV-1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo

In nero: risultato corretto; in rosso: risultato diverso dal valore assegnato

* Il risultato "Non testato" o non fornito è accettato e trattato come "Negativo" per la valutazione dei risultati

Complessivamente, il pannello comprendeva tre (3) APMV-1 positivi e nove (9) APMV-1 negativi

2.3 Schema IN-S

I risultati per lo schema IN-S sono stati presentati da tredici (13) laboratori appartenenti agli II.ZZ.SS..

La Tabella 19 riassume le prestazioni complessive differenziate per misurando, mentre i risultati dei singoli laboratori e i relativi punteggi sono riportati nelle Tabelle da 20 a 23. Dati informativi e risultati aggiuntivi sono riportati nell'APPENDICE I.

Tabella 19. Analisi delle performance complessive per lo schema IN-S.

Misurando	No.*	Accuratezza (%)	k	p-value	Se (%)	Sp (%)
Anticorpi contro virus dell'influenza aviaria	13	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00
Anticorpi contro il sottotipo H5 del virus dell'influenza aviaria	12	99,31	0,97	0,00	97,92	100,00
Anticorpi contro il sottotipo H7 del virus dell'influenza aviaria	12	100,00	1,00	0,00	100,00	100,00
Anticorpi contro il paramyxovirus aviario di tipo 1/NDV	10	98,33	0,92	0,00	93,33	100,00

Se = Sensibilità; Sp = Specificità

* Numero di laboratori che hanno rispettato i criteri di analisi dei campioni

Tabella 20. Risultati per il misurando 'Anticorpi contro i virus dell'influenza aviaria di tipo A'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000550	L000551	
S01	H7N6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S02	H9N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S03	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S04	H5N8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S05§	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S06§	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S07	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S08	H5N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S09	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S10	H7N3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S11§	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S12§	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 20 (continuazione). Risultati per il misurando 'Anticorpi contro i virus dell'influenza aviaria di tipo A'.

Campione		Codice Laboratorio			Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000637	L000685	L000948	
S01	H7N6	P	P	P	100,00
S02	H9N2	P	P	P	100,00
S03	Negativo	N	N	N	100,00
S04	H5N8	P	P	P	100,00
S05§	APMV-1	N	N	N	100,00
S06§	H5N1	P	P	P	100,00
S07	Negativo	N	N	N	100,00
S08	H5N2	P	P	P	100,00
S09	APMV-1	N	N	N	100,00
S10	H7N3	P	P	P	100,00
S11§	H5N1	P	P	P	100,00
S12§	APMV-1	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo

In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

Complessivamente, il pannello comprendeva sette (7) campioni positivi agli anticorpi AIV e cinque (5) negativi

Tabella 21. Risultati per il misurando 'Anticorpi contro il sottotipo H5 dei virus dell'influenza aviaria'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000550	L000551	
S01	H7N6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S02	H9N2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S03	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S04	H5N8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S05§	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S06§	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S07	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S08	H5N2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S09	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S10	H7N3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S11§	H5N1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	91,67
S12§	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 21 (continuazione). Risultati per il misurando 'Anticorpi contro il sottotipo H5 dei virus dell'influenza aviaria'.

Campione		Codice Laboratorio			Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000637	L000685	L000948	
S01	H7N6	N	N	NT	100,00
S02	H9N2	N	N	NT	100,00
S03	Negativo	N	N	NT	100,00
S04	H5N8	P	P	NT	100,00
S05§	APMV-1	N	N	NT	100,00
S06§	H5N1	P	P	NT	100,00
S07	Negativo	N	N	NT	100,00
S08	H5N2	P	P	NT	100,00
S09	APMV-1	N	N	NT	100,00
S10	H7N3	N	N	NT	100,00
S11§	H5N1	N	P	NT	91,67
S12§	APMV-1	N	N	NT	100,00
Accuratezza (%)		91,67	100,00		
Kappa		0,80	1,00		
p-value		0,00	0,00		

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo

In nero: risultato corretto; in rosso: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

Complessivamente, il pannello comprendeva quattro (4) campioni positivi agli anticorpi AIV-H5 e otto (8) negativi

Tabella 22. Risultati per il misurando 'Anticorpi contro il sottotipo H7 dei virus dell'influenza aviaria'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000550	L000551	
S01	H7N6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S02	H9N2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S03	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S04	H5N8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S05§	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S06§	H5N1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S07	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S08	H5N2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S09	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S10	H7N3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	100,00
S11§	H5N1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
S12§	APMV-1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
Kappa		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
p-value		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabella 22 (continuazione). Risultati per il misurando 'Anticorpi contro il sottotipo H7 dei virus dell'influenza aviaria'.

Campione		Codice Laboratorio			Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000637	L000685	L000948	
S01	H7N6	P	P	NT	100,00
S02	H9N2	N	N	NT	100,00
S03	Negativo	N	N	NT	100,00
S04	H5N8	N	N	NT	100,00
S05§	APMV-1	N	N	NT	100,00
S06§	H5N1	N	N	NT	100,00
S07	Negativo	N	N	NT	100,00
S08	H5N2	N	N	NT	100,00
S09	APMV-1	N	N	NT	100,00
S10	H7N3	P	P	NT	100,00
S11§	H5N1	N	N	NT	100,00
S12§	APMV-1	N	N	NT	100,00
Accuratezza (%)		100,00	100,00		
Kappa		1,00	1,00		
p-value		0,00	0,00		

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo

In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

Complessivamente, il pannello comprendeva due (2) campioni positivi agli anticorpi AIV-H7 e dieci (10) negativi

Tabella 23. Risultati per il misurando 'Anticorpi contro i paramyxovirus aviari di tipo 1'.

Campione		Codice Laboratorio										Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000550	L000551	
S01	H7N6	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S02	H9N2	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S03	Negativo	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S04	H5N8	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S05§	APMV-1	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	NT	100,00
S06§	H5N1	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S07	Negativo	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S08	H5N2	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S09	APMV-1	NT	P	P	P	P	P	P	P	P	NT	100,00
S10	H7N3	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S11§	H5N1	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	100,00
S12§	APMV-1	NT	P	P	P	N	P	P	P	P	NT	80,00
Accuratezza (%)			100,00	100,00	100,00	91,67	100,00	100,00	100,00	100,00		
Kappa			1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00		
p-value			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

Tabella 23 (continuazione). Risultati per il misurando 'Anticorpi contro i paramyxovirus aviari di tipo 1'.

Campione		Codice Laboratorio			Accuratezza (%)
ID	Tipo	L000637	L000685	L000948	
S01	H7N6	N	N	NT	100,00
S02	H9N2	N	N	NT	100,00
S03	Negativo	N	N	NT	100,00
S04	H5N8	N	N	NT	100,00
S05§	APMV-1	P	P	NT	100,00
S06§	H5N1	N	N	NT	100,00
S07	Negativo	N	N	NT	100,00
S08	H5N2	N	N	NT	100,00
S09	APMV-1	P	P	NT	100,00
S10	H7N3	N	N	NT	100,00
S11§	H5N1	N	N	NT	100,00
S12§	APMV-1	P	N	NT	80,00
Accuratezza (%)		100,00	91,67		
Kappa		1,00	0,75		
p-value		0,00	0,00		

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Per motivi di formattazione, le abbreviazioni sono utilizzate come P = Positivo, N = Negativo, NT = Non testato
In nero: risultato corretto; in **rosso**: risultato diverso dal valore assegnato, compreso quello indicato come "Non testato" o non fornito non conforme ai criteri di analisi

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

Complessivamente, il pannello comprendeva tre (3) campioni positivi agli anticorpi APMV-1 e nove (9) negativi

3. Discussioni

Ciascun laboratorio è stato valutato secondo criteri basati sul k di Cohen e sul valore p associato (Tabella 9), che riflettono il grado di accordo con i valori assegnati (Tabella 1, Tabella 2 e Tabella 3).

La valutazione attribuita alle prestazioni di ciascun partecipante è riportata nella Tabella 24, Tabella 25 e Tabella 26, rispettivamente per gli schemi IN-M, IN-V e IN-S.

3.1 Schema IN-M

Lo schema è stato eseguito con un tasso di successo del 99,88% e complessivamente, dei ventuno (21) laboratori che vi hanno partecipato, venti (20) sono stati valutati come accettabili per tutti i misurandi e solo uno ha ricevuto un punteggio discutibile per uno dei quattro misurandi analizzati.

Nello specifico, il laboratorio L000549 ha mancato il riconoscimento del campione M07 (H5N1), che è stato riferito come negativo per H5. La ragione all'origine di questo risultato falso negativo è probabilmente da ricondurre ad una subottimale performance del metodo impiegato per il test, cioè la real-time RT-PCR di Slomka et al., 2007, piuttosto che alla carica virale del campione. A riprova di ciò, i campioni M02 (H5N5) e M10 (H5N1) sono stati correttamente assegnati dal laboratorio seppur possedevano una concentrazione in RNA target quasi pari a quella stimata utilizzando metodiche sperimentali per il campione M07 ($M02=10^{4,30}$ copie genomiche (GC)/mL, $M07=10^{4,02}$ GC/mL, $M10=10^{4,00}$ GC/mL).

Questo risultato è in linea con le aspettative. Infatti, le prestazioni non ottimali di questo metodo erano già note al CRN. In particolare, il saggio (corrispondente alla IZSVe PDP VIR 143 rev. 04) ha sempre restituito per tutti i campioni valori di Ct fino a più di 2,5 superiori rispetto a quelli ottenuti con un secondo metodo applicato dal CRN (IZSVe PDP VIR 1004, rev. 00), e nel caso del campione M07 la differenza misurata tra i due è stata maggiore di 6,5 Ct (Tabella S3). La ragione è da attribuire alla presenza di diversi *mismatch* nella regione di annealing del primer *forward* rispetto alla sequenza nucleotidica del virus in M07 che molto probabilmente ha inficiato il successo del metodo su questo campione. Una corretta identificazione del campione è stata inoltre ottenuta con il saggio RT-PCR convenzionale 'IZSVe PDP VIR 125 rev. 04'.

Allo scopo di verificare se il fallimento sia da attribuire ad una subottimale performance del metodo piuttosto che ad un errore procedurale, il laboratorio è incoraggiato a testare nuovamente il campione e comunicare gli esiti al CRN. Qualora vengano ottenuti simili risultati, si raccomanda al laboratorio di considerare la revisione o la sostituzione del metodo impiegato per la diagnosi di H5 secondo le indicazioni del CRN.

3.2 Schema IN-V

I nove (9) laboratori che hanno partecipato allo schema IN-V hanno dimostrato un eccellente livello di competenza nell'esecuzione dell'esercizio, raggiungendo una percentuale di successo del 100%. Tutti i dodici campioni del pannello sono stati correttamente categorizzati rispetto a tutti i misurandi.

3.3 Schema IN-S

I tredici (13) laboratori che hanno partecipato allo schema IN-S hanno dimostrato un eccellente livello di competenza nell'esecuzione dell'esercizio, raggiungendo una percentuale di successo del 99,47%. Ad eccezione di tre risultati falsi negativi, tutti gli esiti riportati sono stati 100% congruenti con quelli attesi.

In particolare, le discrepanze hanno riguardato la corretta determinazione del siero contenuto nel campione S12 (Tabella 23). I laboratori L000544 e L000685 hanno considerato il campione negativo agli anticorpi contro APMV-1, mentre hanno correttamente identificato il campione S05 ad esso correlato, cioè il campione contenente lo stesso siero di S12 preparato ad una diluizione inferiore (titolo HI rispetto all'antigene omologo pari a 1:128 e 1:4096, rispettivamente. Tabella 3).

L'origine di tali esiti sembra essere legata alle caratteristiche del ceppo utilizzato per la preparazione del siero S12, cioè un ceppo velogeno recente appartenente al genotipo VII.2. È assai probabile che la distanza antigenica esistente tra questo e gli antigeni utilizzati nei test possa aver compromesso gli esiti ottenuti per il campione con il titolo più basso. La difficoltà nel riconoscere questo siero è confermata dai valori di titolo HI bassi riportati dalla maggior parte dei partecipanti. Infatti, il 67% di questi si collocava tra 1:8 e 1:16, con un valore modale pari a 1:16 calcolato su 8 osservazioni (Tabella S7).

Il rimanente risultato errato è stato trasmesso per la rilevazione degli anticorpi contro AIV-H5 (Tabella 21), per cui è stata ottenuta un'accuratezza complessiva del 99,31% con i valori assegnati (Tabella 10). Il campione S11 (HPAIV H5N1, titolo HI rispetto all'antigene omologo = 1:64) è stato classificato come negativo da L000637 che ha invece identificato correttamente il campione S06, che conteneva lo stesso siero policlonale

di S11 ma preparato a una diluizione inferiore (titolo HI rispetto all'antigene omologo = 1:512). Vale la pena notare che il falso negativo presentato da questo laboratorio è stato molto probabilmente la conseguenza di un errore di inserimento dei dati. Infatti, è stata notata una discrepanza tra il risultato indicato e le informazioni supplementari fornite. Il campione è stato riferito come negativo rispetto all'antigene H5N9 ma positivo verso l'antigene H5N1 utilizzato (titolo HI = 1:16. Tabella S13).

Tabella 24. Valutazione assegnata per lo schema IN-M.

Codice laboratorio	Misurando			
	AIV (gene M/NP)	AIV-H5	AIV-H7	APMV-1
L000342	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000348	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000356	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000358	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000390	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000399	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000411	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000438	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000452	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000455	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000469	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000503	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000526	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000527	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000544	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000546	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000548	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000549	Accettabile	Discutibile	Accettabile	Accettabile
L000586	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000637	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000685	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile

Tabella 25. Valutazione assegnata per lo schema IN-V.

Codice laboratorio	Misurando		
	AIV-H5	AIV-H7	APMV-1
L000399	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000438	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000469	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000526	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000544	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000546	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000548	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000549	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000637	Accettabile	Accettabile	Accettabile

Tabella 26. Valutazione assegnata per lo schema IN-S.

Codice laboratorio	Misurando			
	AIV (Abs)	AIV-H5 (Abs)	AIV-H7 (Abs)	APMV-1 (Abs)
L000342	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000399	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000438	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000526	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000544	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Discutibile
L000546	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000548	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000549	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000550	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000551	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
L000637	Accettabile	Discutibile	Accettabile	Accettabile
L000685	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Discutibile
L000948	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile

4. Conclusioni

Il PT AQUA IN organizzato dal CRN per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle nell'edizione del 2025 ha visto la partecipazione di ventiquattro (24) laboratori nazionali. Nel complesso, i risultati dell'esercizio confermano un elevato livello di competenza dei laboratori per l'identificazione e la caratterizzazione di AIV e APMV-1 mediante tecniche molecolari, virologiche e sierologiche che non richiedono significativi interventi correttivi.

In ogni caso, si raccomanda a tutti i partecipanti che hanno ottenuto risultati non conformi di riesaminare i campioni per i quali non sia stata fornita un'interpretazione accurata per escludere errori tecnici verificatisi durante la fase analitica che potrebbero aver compromesso il successo dei metodi in uso. Nel caso in cui si ottengano nuovamente risultati simili, si suggerisce una revisione delle procedure o l'adozione di protocolli alternativi che si siano dimostrati idonei allo scopo. Un'ulteriore azione correttiva dovrebbe prendere in considerazione anche la possibilità di rivalutare l'algoritmo diagnostico attualmente utilizzato.

Tali azioni correttive sono fortemente incoraggiate anche nel caso in cui le procedure e i metodi impiegati avessero restituito risultati corretti ma con valori che si discostano significativamente e sistematicamente dai valori medi stimati sulla base dei dati del CRN. Considerato l'attuale scenario epidemiologico, tali raccomandazioni risultano particolarmente rilevanti per l'identificazione di virus o anticorpi A(H5Nx), nonché per i virus influenzali aviari del sottotipo H7 mediante saggi molecolari. Infatti, sebbene non sia stato riportato alcun esito falso negativo per il misurando H7, il CRN ritiene opportuno segnalare che il saggio real-time 'IZSVe PDP VIR 144 rev. 03' non ha mai consentito l'identificazione del campione M01 (H7N6), anche in presenza di una concentrazione di RNA virale target nel campione pari a $1 \times 10^{9,85}$ GC/mL. Tale insuccesso è da attribuire alla presenza di numerosi *mismatch* nella regione di annealing del set di oligonucleotidi di questo metodo rispetto alla sequenza consenso del ceppo in M01. Al contrario, un corretto riconoscimento del campione è stato ottenuto applicando la metodica RT-PCR convenzionale 'IZSVe PDP VIR 126 rev. 04', nonché il saggio real-time 'IZSVe PDP VIR 1004 rev. 00' validato e recentemente accreditato dal CRN.

Alla luce di queste considerazioni, i laboratori sono pertanto invitati a tenere aggiornati i propri metodi analitici e ad adottare tutte le azioni necessarie per garantire un'accurata identificazione dei patogeni di interesse, in accordo a quanto raccomandato dal CRN.

Il CRN si rende disponibile ad offrire un servizio di follow-up ai partecipanti che ne facessero richiesta allo scopo di individuare la causa di eventuali errori o discrepanze, mettere in atto le necessarie misure correttive e garantire adeguato supporto per l'implementazione dei test diagnostici raccomandati dal Centro di Referenza Nazionale presso i propri laboratori. Si ricorda che tali metodi sono disponibili nel [sito web IZSVe](#).

Ringraziamenti

Il Laboratorio Organizzatore desidera ringraziare tutti i partecipanti per il tempo e l'impegno dedicati all'analisi dei campioni e per aver rispettato i tempi stabiliti per l'invio dei risultati. Ci auguriamo che la partecipazione a questo Proficiency Testing e i suggerimenti forniti in questo report possano migliorare le prestazioni diagnostiche dei partecipanti.

Il Laboratorio Organizzatore desidera inoltre ringraziare Laura Boscarato, Lorenza Boscolo, Valeria D'Amico, Alessandra D'Anna, Silvia Maniero e Crispina Veggiato per il loro impegno costante nel garantire che i campioni del presente PT fossero idonei allo scopo.

Data report finale: 10/06/2025

Dr. Calogero Terregino
Responsabile Proficiency Testing AQUA IN



Bibliografia

Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J et al. 2019. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infect Genet Evol.* 74:103917. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103917.

Fusaro A, Pu J, Zhou Y, Lu L, Tassoni L, Lan Y, Lam TT, Song Z, Bahl J, Chen J, Gao GF, Monne I, Liu J; International H9 Evolution Consortium. 2024. Proposal for a Global Classification and Nomenclature System for A/H9 Influenza Viruses. *Emerg Infect Dis.* 30(8):1-13. doi: 10.3201/eid3008.231176.

Hassan KE, Ahrens AK, Ali A, El-Kady MF, Hafez HM, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. 2022. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses* 14(2):415. <https://doi.org/10.3390/v14020415>.

Heine HG, Foord AJ, Wang J, et al. 2015. Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction. *Viol J.* 12:18. doi:10.1186/s12985-015-0250-3.

ISO 13528:2022 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.

ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment - General requirements for the competence of proficiency testing providers.

Slomka MJ, Pavlidis T, Coward VJ, Voermans J, Koch G, Hanna A, Banks J and Brown IH. 2009. Validated RealTime reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3:151-164.

Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J, Shell W, McNally A, Essen S, Brown IH. 2007. Validated H5 Eurasian Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Its Application in H5N1 Outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis.* 51(1):373-377.

Sutton DA, Allen DP, Fuller CM, Mayers J, Mollett BC, Löndt BZ, Reid SM, Mansfield KL, Brown IH. 2019. Development of an avian avulavirus 1 (AAvV-1) L-gene real-time RT-PCR assay using minor groove binding probes for application as a routine diagnostic tool. *J Virol Methods* 265:9-14.

APPENDICE I – DATI OPZIONALI*

Schema AQUA IN-M	46
Schema AQUA IN-V	57
Schema AQUA IN-S	59

* I risultati e i dati riportati nella presente appendice non sono oggetto di accreditamento ACCREDIA. Sono raccolti ed elaborati esclusivamente a scopo informativo e per l'autovalutazione da parte dei partecipanti. In alcuni casi, possono aiutare nell'interpretazione dei risultati.

Schema AQUA IN-M

Tabella S1. Metodi impiegati per lo schema AQUA IN-M.

Codice laboratorio	AIV (M/NP)	AIV-H5	AIV-H7	APMV-1
L000342	PDP VIR 018 rev, 09	PDP VIR 143 rev,04, PDP VIR 1004 rev,00	PDP VIR 1004 rev,00	/
L000348	PDP VIR 018 2024 Rev, 8 + ALL PDP 1000 2023 Rev, 1	-	-	-
L000356	Kylt® Influenza A Real-Time RT-PCR Detection Kit for Avian Influenza Virus Type A,	-	-	-
L000358	metodica in uso fornita dal CDR	non eseguito	non eseguito	non eseguito
L000390	Ricerca del DNA dei Virus Responsabili dell'INFLUENZA AVIARIA del tipo A mediante RT-PCR,	RT PCR	RT PCR	non eseguito
L000399	Metodo fornito dall'IZS Venezie PDP VIR 018 rev 09 -12/24	Metodo fornito dall'IZS Venezie PDP VIR 143 rev 04 -07/24	Metodo fornito dall'IZS Venezie SOP VIR 1001 (Van Borm et al., 2010 modified)	Metodo fornito dall'IZS Venezie PDP VIR 151 rev 03 -05/22
L000411	Rilevazione del virus dell'influenza aviaria (tipo A) mediante real-time RT-PCR (Heine et al,2015; Lanconi et al., 2020) (Rev 08-03/24)	Rilevazione non eseguita dal laboratorio	Rilevazione non eseguita dal laboratorio	Rilevazione del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1) mediante Real-time RT-PCR (Sutton et al., 2019) (rev, 03 – 05/22)
L000438	Protocollo Real-time PCR Influenza aviare AIV-SOPVIR1000+SOPVIR018 EURL AI/ND 2021	Monne et al, Development and Validation of a One-Step Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Subtype H5, H7, and H9 Avian Influenza Viruses, Journal of Clinical Virology, 2008	Monne et al, Development and Validation of a One-Step Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Subtype H5, H7, and H9 Avian Influenza Viruses, Journal of Clinical Virology, 2008	Protocollo Real-time PCR NDV-EURL AI/ND SOPVIR151 rev,2
L000452	PO 46 rev,2:2020	Indical	Indical	Life Technologies
L000455	Rilevazione del virus dell'influenza aviaria (tipo A) mediante real-time RT-PCR (Heine et al., 2015; Laconi et al., 2020)	non testato	non testato	non testato
L000469	IZS VENEZIE PDP VIR 018 Rev,09-12/24	IZS VENEZIE PDP VIR 143 Rev,04-08/24	IZS VENEZIE PDP VIR 144 Rev,03-06/22	IZS VENEZIE PDP VIR 151 Rev,03-05/22

Tabella S1 (continuazione). Metodi impiegati per lo schema AQUA IN-M.

Codice laboratorio	AIV (M/NP)	AIV-H5	AIV-H7	APMV-1
L000503	gene M-Mp 09/032 ONESTEP REAL-TIME PCR: SLOMKA M,J,, DENSHAM A,L,, COWARD V,J,, ESSEN S,, BROOKES S,M,, IRVINE R,M,, SPACKMAN E,, RIDGEON J,, GARDNER R,, HANNA A,, SUAREZ D,L, & BROWN I,H, (2010), Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs, Influenza Other Respir, Viruses, 4, 277–293,	non eseguito	non eseguito	non eseguito
L000526	RT-PCR Convenzionale "END-POINT" Gene M (Spackman et al, adattato)	RT-PCR Convenzionale "END-POINT" (Slomka et al, 2007)	RT-PCR Convenzionale "END-POINT" (Slomka et al, 2007) - PDP VIR 126 Rev,01-03/16	Real Time RT-PCR (Wise et al, 2004)
L000527	Ricerca del virus dell' influenza A (DAQIOBM000025); Ricerca del Virus dell'Influenza A con il kit virotype® Influenza A RT-PCR (Indical Bioscience) (DAQIOBM000048)	Tipizzazione Influenza A con kit virotype® Influenza A H5/H7/H9 Indical (DAQIOBM000061)	Tipizzazione Influenza A con kit virotype® Influenza A H5/H7/H9 Indical (DAQIOBM000061)	Rilevazione del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV1) mediante Real Time PCR (DAQIOBM000044)
L000544	PDP VIR 018 Rilevazione del virus dell'influenza aviaria tipo A mediante real time RT-PCR Rev 09 12/24	PDP VIR 143 Rilevazione del virus dell'Influenza aviaria sottotipo H5 mediante reverse transcriptase Real Time PCR Rev,04 06/24	I,Monne et al,2008 (Journal of Clinical Microbiology)	PDP VIR 151 Rilevazione del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1) mediante Real-time RT-PCR Rev, 03 05/22

Tabella S1 (continuazione). Metodi impiegati per lo schema AQUA IN-M.

Codice laboratorio	AIV (M/NP)	AIV-H5	AIV-H7	APMV-1
L000546	Spackmann E, et al, (2002), Journal of Clinical Microbiology 40:3256-3260 (RT Real Time PCR)	Rilevazione virus euroasiatici dell'influenza aviaria sottotipo H5 mediante reverse transcriptase Real Time PCR (PdP VIR 143, rev, 02 – 02/19); Rilevazione virus euroasiatici dell'influenza aviaria sottotipo H5 mediante one step reverse transcriptase PCR e sequenziamento Sanger (PdP VIR 125 rev, 03 – 02/19)	Rilevazione virus euroasiatici dell'influenza aviaria sottotipo H7 mediante reverse transcriptase Real Time PCR (PdP VIR 144, rev, 02 – 02/19); Rilevazione virus euroasiatici dell'influenza aviaria sottotipo H7 mediante one step reverse transcriptase PCR e sequenziamento Sanger (PdP VIR 126 rev, 03 – 02/19)	PdP VIR 151 Rev,03-05/22 "rilevazione del Paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1) mediante Real Time RT-PCR, IZSVe"
L000548	MP09/032 - Real time one step (Spackman et al, 2002)	MP 09/038 rev1 (basata sul protocollo fornito dal CdR)	MP 09/039 rev1 (basata sul protocollo fornito dal CdR); Detection of Eurasian H7 Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Van Borm et al., 2010 modified)	MP 09/035 rev 0 (basata sul protocollo fornito dal CdR)
L000549	Rilevazione del virus dell'influenza aviaria (tipo A) mediante real-time RT-PCR- PDP VIR 018	Rilevazione di virus H5 Euroasiatici dell'Influenza aviaria mediante real-time RT-PCR-PDP VIR 143	Rilevazione di virus H7 Euroasiatici dell'Influenza aviaria mediante real-time RT-PCR-PDP VIR 144	VetMax NDV Reagents-Applied Biosystems
L000586	gene M(M64)-Mp 09/032 - One step RT-Real-Time PCR- rif, Slomka et al 2010	metodica -One step RT-Real-Time PCR - CdR: M,J, Slomka, 2007 doi: 10,1637/7664-060906R1,1 - Eseguita anche one step rt-PCR Slomka 2007- DOI: 10,1637/7674-063006R1,1	metodica -One step RT-Real-Time PCR - CdR: M,J, Slomka, 2007 doi: 10,1637/7664-060906R1,1 - Eseguita anche one step rt-PCR Slomka 2007- DOI: 10,1637/7674-063006R1,1	//
L000637	Real Time One Step gene M, PDP VIR 018 Rev,08-03/24	AIV Sottotipo H5: Real Time one Step, PDP VIR 143 Rev, 03-06/22	AIV Sottotipo H7: Real Time one Step, PDP VIR 144 Rev, 03-06/22	Newcastle disease virus (NDV): Real Time one Step, Wise M,G, et al., 2004
L000685	Real Time One Step Gene M, Spackman M, et al, 2002	rRT One Step H5-H7 - H9 Monne I, et al, 2008	rRT One Step H5-H7 - H9 Monne I, et al, 2008	Protocollo Real Time PCR IZS Venezie - PDP VIR 151 Rev,02 - 06/20

I dati sono fedelmente riportati come presentati

Tabella S2. Valori di Ct per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene M/NP)'.

Campione		Codice laboratorio													
ID	Tipo	L000342	L000348	L000356	L000358	L000390	L000399	L000411	L000438	L000452	L000455	L000469	L000503	L000526	L000527
M01	H7N6	27,94	23,69	21,54	27,49	24,62	24,18	27,47	26,50	26,48	25,75	24,50	27,00	P	P
M02	H5N5	32,52	29,01	27,82	32,76	29,57	29,30	32,96	31,70	33,72	30,84	29,50	33,00	P	P
M03	Negativo	N	N	N	N	0,00	N	0,00	N	N	N	Undet	N	N	N
M04	H5N1	26,44	22,70	19,23	26,58	23,48	22,24	25,62	25,00	24,10	24,22	23,10	26,00	P	P
M05	APMV-1	N	N	N	N	0,00	N	0,00	N	N	N	Undet	N	N	N
M06	H9N2	34,69	30,62	28,11	33,55	30,85	29,7	34,02	33,00	32,5	32,86	30,02	34,00	P	P
M07	H5N1	29,50	26,06	24,46	30,76	27,08	26,2	30,23	28,50	28,65	27,97	27,03	30,00	P	P
M08	H7N3	30,87	26,81	24,54	30,79	24,65	27,01	30,94	29,40	29,41	29,13	27,20	30,00	P	P
M09	APMV-1	N	N	N	N	0,00	N	0,00	N	N	N	Undet	N	N	N
M10	H5N1	31,30	27,60	24,98	31,29	27,70	27,36	32,00	30,00	29,16	29,41	27,50	31,00	P	P
M11	H9N2	28,70	25,51	22,53	29,86	32,02	25,60	29,32	27,80	28,56	27,55	25,50	29,00	P	P
M12	Negativo	N	N	N	N	0,00	N	0,00	N	N	N	Undet	N	N	N
M13	APMV-1	N	N	N	N	0,00	N	0,00	N	N	N	Undet	N	N	N

Campione		Codice laboratorio							No.*	Mediana	Min	Max	nIQR	rCV (%)	CRN (9)
ID	Tipo	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	L000685							
M01	H7N6	25,05	26,49	24,40	27,00	27,13	26,68	23,24	19	26,48	21,54	27,94	1,89	7,14	25,40
M02	H5N5	30,09	31,85	33,10	31,60	32,19	32,02	28,20	19	31,70	27,82	33,72	2,30	7,26	30,69
M03	Negativo	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40							
M04	H5N1	23,60	26,34	23,30	24,50	25,44	24,61	22,10	19	24,22	19,23	26,58	1,73	7,13	23,75
M05	APMV-1	No ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40							
M06	H9N2	31,90	33,10	32,00	34,00	33,24	33,42	29,31	19	32,86	28,11	34,69	2,04	6,20	31,80
M07	H5N1	27,50	29,64	28,40	29,10	29,69	29,27	25,50	19	28,50	24,46	30,76	1,86	6,54	27,33
M08	H7N3	28,17	29,27	28,60	30,80	29,35	29,20	27,29	19	29,20	24,54	30,94	1,82	6,25	28,56
M09	APMV-1	No ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40							
M10	H5N1	29,30	31,08	27,30	32,30	31,80	30,23	28,27	19	29,41	24,98	32,30	2,62	8,91	29,56
M11	H9N2	26,70	28,46	27,60	27,80	29,69	28,00	25,97	19	27,80	22,53	32,02	1,86	6,71	27,09
M12	Negativo	No ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40							
M13	APMV-1	No ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40							

Legenda alla Tabella S2

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Quando il valore Ct non è stato fornito, è stato riportato l'esito, abbreviato per esigenze di formattazione come segue: N = Negativo, NT = Non testato. In assenza di qualsiasi risultato, la cella corrispondente è stata lasciata vuota

nIQR = Range interquartile normalizzato, rCV = Coefficiente di variazione robusto

* Numero di risultati dati come positivi e associati ad un valore di Ct

() Metodo di riferimento:

(9) IZSVe PDP VIR 018, rev. 09 (Heine et al., 2015)

Tabella S3. Valori di Ct per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5'.

Campione		Codice laboratorio													
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000452	L000469	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	L000685
M01	H7N6	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M02	H5N5	32,91	29,42	36,02	35,12	37,02	P	34,37	32,8	31,35	30,90	37,6	30,64	32,24	30,78
M03	Negativo	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M04	H5N1	24,10	21,06	27,60	26,16	31,09	P	26,37	23,1	22,49	24,10	29,1	22,20	25,14	22,27
M05	APMV-1	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M06	H9N2	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M07	H5N1	29,73	30,60	30,80	32,19	29,03	P	30,17	29,5	30,72	30,70	n,d,	28,15	38,70	30,78
M08	H7N3	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M09	APMV-1	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M10	H5N1	30,16	26,35	33,60	31,77	35,40	P	29,87	29,9	28,18	28,70	36,1	27,42	32,75	26,85
M11	H9N2	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M12	Negativo	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40
M13	APMV-1	N	N	N	N	Undet	N	N	No.ct	N	N	n,d,	N	≥40	≥40

Tabella S3 (continuazione). Valori di Ct per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H5'.

Campione		No.*	Mediana	Min	Max	nIQR	rCV (%)	CRN	
ID	Tipo							(33)	(20)
M01	H7N6								
M02	H5N5	13	32,80	29,42	37,60	3,13	9,54	30,42	32,98
M03	Negativo								
M04	H5N1	13	24,10	21,06	31,09	2,88	11,93	22,17	24,03
M05	APMV-1								
M06	H9N2								
M07	H5N1	12	30,65	28,15	38,70	0,82	2,69	30,13	36,69
M08	H7N3								
M09	APMV-1								
M10	H5N1	13	29,90	26,35	36,10	3,39	11,33	28,63	30,95
M11	H9N2								
M12	Negativo								
M13	APMV-1								

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Quando il valore Ct non è stato fornito, è stato riportato l'esito, abbreviato per esigenze di formattazione come segue: N = Negativo, NT = Non testato. In assenza di qualsiasi risultato, la cella corrispondente è stata lasciata vuota

nIQR = Range interquartile normalizzato, rCV = Coefficiente di variazione robusto

* Numero di risultati dati come positivi e associati ad un valore di Ct

() Metodo di riferimento:

(20) IZSVe PDP VIR 143, rev. 04 (Slomka et al., 2007)

(33) IZSVe PDP VIR 1004, rev. 00 (Hassan et al., 2022)

Tabella S4. Valori di Ct per il misurando 'Virus dell'influenza aviaria (gene HA) - Identificazione del sottotipo H7'.

Campione		Codice laboratorio													
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000452	L000469	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000586	L000637	L000685
M01	H7N6	28,04	27,66	30,90	28,51	28,03	P	26,16	31,00	31,76	29,80	28,80	33,60	27,08	27,20
M02	H5N5	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M03	Negativo	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M04	H5N1	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M05	APMV-1	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M06	H9N2	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M07	H5N1	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M08	H7N3	30,64	27,74	33,10	32,38	29,80	P	30,75	39,50	32,64	31,00	31,30	32,39	19,17	29,58
M09	APMV-1	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M10	H5N1	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M11	H9N2	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M12	Negativo	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40
M13	APMV-1	N	N	N	N	Undet	N	N	No ct	N	N	n,d	N	≥40	≥40

Campione		No.*	Mediana	Min	Max	nIQR	rCV (%)	CRN	
ID	Tipo							(33)	(18)
M01	H7N6	13	28,51	26,16	33,60	2,40	8,42	27,77	>45,00
M02	H5N5								
M03	Negativo								
M04	H5N1								
M05	APMV-1								
M06	H9N2								
M07	H5N1								
M08	H7N3	13	31,00	19,17	39,50	1,92	6,19	29,56	33,36
M09	APMV-1								
M10	H5N1								
M11	H9N2								
M12	Negativo								
M13	APMV-1								

Legenda alla Tabella S4

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Quando il valore Ct non è stato fornito, è stato riportato l'esito, abbreviato per esigenze di formattazione come segue: N = Negativo, NT = Non testato. In assenza di qualsiasi risultato, la cella corrispondente è stata lasciata vuota

nIQR = Range interquartile normalizzato, rCV = Coefficiente di variazione robusto

* Numero di risultati dati come positivi e associati ad un valore di Ct

() Metodo di riferimento:

(18) IZSVe PDP VIR 144, rev. 03 (Slomka et al., 2009)

(33) IZSVe PDP VIR 1004, rev. 00 (Hassan et al., 2022)

Tabella S5. Valori di Ct per il misurando 'Paramyxovirus aviario di tipo 1'.

Campione		Codice laboratorio												
ID	Tipo	L000399	L000411	L000438	L000452	L000469	L000526	L000527	L000544	L000546	L000548	L000549	L000637	L000685
M01	H7N6	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M02	H5N5	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M03	Negativo	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M04	H5N1	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M05	APMV-1	32,90	34,66	29,50	30,23	30,90	32,40	34,34	36,90	32,41	31,00	27,60	33,50	32,18
M06	H9N2	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M07	H5N1	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M08	H7N3	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M09	APMV-1	27,10	27	24,30	29,68	24,10	25,87	31,97	27,22	26,38	27,60	23,20	32,80	25,72
M10	H5N1	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M11	H9N2	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M12	Negativo	N	0,00	N	N	Undet	≥40	N	Noct	N	N	n,d,	≥40	≥40
M13	APMV-1	31,58	31,76	28,50	30,88	28,10	31,66	32,21	34,60	30,46	33,00	30,60	33,16	30,78

Tabella S5 (continuazione). Valori di Ct per il misurando 'Paramyxovirus aviario di tipo 1'.

Campione		No.*	Mediana	Min	Max	nIQR	rCV (%)	CRN
ID	Tipo							(14)
M01	H7N6							
M02	H5N5							
M03	Negativo							
M04	H5N1							
M05	APMV-1	13	32,40	27,60	36,90	1,93	5,95	28,44
M06	H9N2							
M07	H5N1							
M08	H7N3							
M09	APMV-1	13	27,00	23,20	32,80	1,39	5,16	21,93
M10	H5N1							
M11	H9N2							
M12	Negativo							
M13	APMV-1	13	31,58	28,10	34,60	1,19	3,78	27,30

I dati sono fedelmente riportati come presentati. Quando il valore Ct non è stato fornito, è stato riportato l'esito, abbreviato per esigenze di formattazione come segue: N = Negativo, NT = Non testato. In assenza di qualsiasi risultato, la cella corrispondente è stata lasciata vuota

nIQR = Range interquartile normalizzato, rCV = Coefficiente di variazione robusto

* Numero di risultati dati come positivi e associati ad un valore di Ct

() Metodo di riferimento:

(14) IZSVe PDP VIR 151, rev. 03 (Sutton et al., 2019)

Tabella S6. Risultati da test aggiuntivi e commenti.

Campione		Codice laboratorio				
ID	Tipo	L000342	L000399	L000452	L000527	L000544
M01	H7N6				BM48 POS ct, 25,68	H7 negativo con PDR VIR 144 Rev 03 06/22
M02	H5N5	Per H5 inserito esito PDP VIR 1004			BM48 POS ct 30,68	
M03	Negativo				BM48 negativo	
M04	H5N1	Per H5 inserito esito PDP VIR 1004			BM48 POS ct 24,07	
M05	APMV-1				BM48 negativo	Pos LproMGB2
M06	H9N2		AIV H9, Ct 30,5 PDP VIR 014 rev 05 01/23	AIV H9, Ct 34,41	AIV H9 BM48 POS ct 33,29	AIV H9, Pos H9 ct 33,6 I, Monne et al, 2008
M07	H5N1	Per H5 inserito esito PDP VIR 1004			BM48 POS ct 27,65	
M08	H7N3				BM48 POS ct 28,54	H7 negativo con PDR VIR 144 Rev 03 06/22
M09	APMV-1				BM48 negativo	Pos ct 27,22 LproMGB - Pos ct 28,36 LproMGB2
M10	H5N1	Per H5 inserito esito PDP VIR 1004			BM48 POS ct 28,20	
M11	H9N2		AIV H9, Ct 25,7 PDP VIR 014 rev 05 01/23	AIV H9, Ct 30,03	AIV H9 BM48 POS ct 27,98	Pos H9 ct 26,6 I, Monne et al, 2008
M12	Negativo				BM48 negativo	
M13	APMV-1				BM48 negativo	Pos LproMGB

Tabella S6 (continuazione). Risultati da test aggiuntivi e commenti.

Campione		Codice laboratorio	
ID	Tipo	L000586	L000637
M01	H7N6	AIV H7, Curva Real-Time poco efficiente, eseguita anche PCR con metodo M,J, Slomka, con esito chiaramente positivo	Negativo anche per H9
M02	H5N5		Negativo anche per H9
M03	Negativo		Negativo anche per H9
M04	H5N1		Negativo anche per H9
M05	APMV-1		Negativo anche per H9
M06	H9N2		AIV H9, Positivo H9 con ct 16,05
M07	H5N1		Negativo anche per H9
M08	H7N3		AIV H7, Negativo anche per H9
M09	APMV-1		Negativo anche per H9
M10	H5N1		Negativo anche per H9
M11	H9N2		AIV H9, Positivo H9 con ct 20,48
M12	Negativo		Negativo anche per H9
M13	APMV-1		Negativo anche per H9

Schema AQUA IN-V

Tabella S7. Titoli HA.

Campione		Codice laboratorio									No.*	Titolo HA (valore modale)	
ID	Tipo	L000399	L000438	L000469	L000526	L000544	L000546	L000548	L000549	L000637		Partecipanti	CRN
V01	H7N3	1:256	1:512	1:256	1:128	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128	9	1:256	1:128
V02	H5N1	1:256	1:512	1:512	1:128	1:128	1:256	1:256	1:256	1:128	9	1:256	1:256
V03	APMV-1	1:256	1:1024	1:1024	1:256	1:512	1:256	1:256	1:256	1:128	9	1:256	1:256
V04	H5N3	1:64	1:256	1:128	1:64	1:128	1:128	1:64	1:128	1:64	9	1:64/1:128	1:128
V05	H9N2	1:128	1:512	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:128	1:128	9	1:64	1:256
V06	H5N5	1:128	1:128	1:256	1:128	1:128	1:64	1:128	1:128	1:64	9	1:128	1:128
V07	APMV-1	1:512	1:512	1:2048	1:512	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:1024	9	1:512	1:256
V08	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9		
V09	H7N6	1:128	1:256	1:512	1:128	1:128	1:128	1:128	1:256	1:128	9	1:128	1:256
V10	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9		
V11	Negativo	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9		
V12	APMV-1	1:64	1:128	1:256	1:64	1:128	1:64	1:64	1:64	1:128	9	1:64	1:64

* Numero di laboratori che hanno fornito il valore del titolo HA

Tabella S8. Risultati da test aggiuntivi.

ID	Tipo	L000399	L000544	L000548	L000637
V05	H9N2	AIV H9, titolo 1:128	AIV H9, titolo 1:64	AIV H9, titolo 1:64	virus emoagglutinante (EAV) non H5, H7 (H9), titolo 1:128

Tabella S9. Risultati dei test HI eseguiti dal CRN.

				CAMPIONE								
				V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V09	V12
SIERO				H7N3	H5N1	APMV1	H5N3	H9N2	H5N5	APMV1	H7N6	APMV1
Antigene immunogeno	Tipo	Patotipo	Titolo [^]	LPAI	LPAI	Virulento	LPAI	LPAI	HPAI	Avirulento	HPAI	Virulento
A/chicken/Scotland/1/59	H5N1	HPAI	1:512	N	1:256	N	1:1024	N	1:16	N	N	N
A/teal/England/7394-2805/06	H5N3	LPAI	1:512	1:8	1:512	N	1:512	N	1:32	N	N	N
A/wigeon/Italy/16VIR9616-3/2016	H5N5	HPAI	1:512	NT	NT	NT	NT	NT	1:128	NT	NT	NT
A/African starling/England/983/79	H7N1	LPAI	1:512	1:256	N	N	N	N	N	N	1:256	N
A/turkey/England/647/77	H7N7	LPAI	1:512	1:1024	N	N	N	N	N	N	1:1024	N
A/mallard/Italy/3817-34/05	H9N2	LPAI	1:512	1:4	N	N	N	1:16	N	N	1:2	N
A/turkey/Wisconsin/66	H9N2	LPAI	1:512	NT	NT	NT	NT	1:128	NT	NT	NT	NT
APMV-1 Ulster 2C	APMV1	Avirulento	1:1024	N	N	1:256	N	N	N	1:512	N	1:64
APMV-1/dove/Italy/4400/2000	APMV1	Virulento	1:256	N	N	1:64	N	N	N	1:64	N	1:256

[^] Titolo anticorpale determinato come la più alta diluizione di siero che causa la completa inibizione dell'attività emoagglutinante di 4 unità di antigene omologo
N = Negativo; NT = Non testato

Schema AQUA IN-S

Tabella S10. Kit Elisa usati.

Codice Laboratorio	Kit
CRN	ID.Vet - ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-Species
L000342	ID Screen Influenza A Antibody Competition Multi-Species (IDVet) Lotto n° N94
L000399	ID,Vet
L000438	ID,VET ID SCREEN INFLUENZA A ANTIBODY COMPETITION MULTI-SPECIES
L000526	Influenza A Virus Antibody Test Kit - IDEXX
L000544	Ingezim Influenza A 10,FLU,K,3 lotto 240250 exp, 02-2026 - Ingenasa
L000546	In house
L000548	Mab-based competitive ELISA
L000549	ID Screen Influenza A Antibody Competition Multi-species
L000550	ID SCREEN INFLUENZA ANTIBODY COMPETITION 192 R
L000551	KIT INGEZIM INFLUENZA A - 10,FLU,K,3; LOTTO 240196; Per l' INIBIZIONE sono stati usati gli antigeni H5N1 e H7N1;
L000637	ID SCREEN INFLUENZA A Ab COMPETITION MULTISPECIE
L000685	ID,Vet ID Screen Influenza A Antibody Competition - Multi species
L000948	ID Screen Influenza A Antibody Competition-Multispecies ID Screen Newcastle Disease Competition

Tabella S11. Moda dei titoli HI.

Campione		Codice laboratorio						
ID	Tipo	L000342	L000399	L000438	L000526	L000544	L000546	L000548
S01	H7N6	1:128	1:256	1:1024	1:256	1:128	1:128	1:256
S02	H9N2		neg		NEG	neg		
S03	Negativo		neg		NEG	neg		
S04	H5N8	1:32	1:128	1:512	1:32	1:32	1:256	1:128
S05§	APMV-1		1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256
S06§	H5N1	1:256	1:128	1:64	1:256	1:128	1:256	1:256
S07	Negativo		neg		NEG	neg		
S08	H5N2	1:128	1:64	1:32	1:128	1:64	1:64	1:64
S09	APMV-1		1:64	1:128	1:128	1:128	1:64	1:64
S10	H7N3	1:32	1:128	1:128	1:64	1:32	1:128	1:128
S11§	H5N1	1:32	1:32	1:64	1:32	1:32	1:32	1:32
S12§	APMV-1		1:16	1:16	1:32	neg	1:16	1:16

Campione		Codice laboratorio					No.**	Titolo HI*
ID	Tipo	L000549	L000550	L000551	L000637	L000685		
S01	H7N6	1:256	1:256	1:256	128	1:256	12	1:256
S02	H9N2	neg,	NEGATI	0	neg			
S03	Negativo	neg,	NEGATI	0	neg			
S04	H5N8	1:64	1:16	1:16	1:16	1:32	12	1:32
S05§	APMV-1	1:128	1:256		1:256	1:256	10	1:256
S06§	H5N1	1:128	1:128	1:128	1:16	1:128	12	1:128
S07	Negativo	neg,	NEGATI	0	neg			
S08	H5N2	1:128	1:128	1:128	1:32	1:256	12	1:128
S09	APMV-1	1:64	1:128		1:128	1:64	10	1:64/1:128
S10	H7N3	1:64	1:64	1:128	1:64	1:128	12	1:128
S11§	H5N1	1:64	1:64	1:64	neg	1:16	11	1:32
S12§	APMV-1	1:8	1:32		1:16		8	1:16

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

* Valore modale dei titoli HI ottenuti dai laboratori partecipanti e calcolato sui valori $\geq 1:8$

** Numero di valori $\geq 1:8$

Tabella S12. Risultati dei test HI eseguiti dal CRN.

Antigene emoagglutinante	HAU	Cut-off [^]	Campione											
			S01	S02	S03	S04	S05§	S06§	S07	S08	S09	S10	S11§	S12§
			H7N6	H9N2	N	H5N8	APMV-1	H5N1	N	H5N2	APMV-1	H7N3	H5N1	APMV-1
H5N1 A/chicken/Scotland/1/59	4	≥1:16	<1:2	<1:2	<1:2	1:32	<1:2	1:128	<1:2	1:128	<1:2	<1:2	1:16	<1:2
H5N3 A/teal/England/7394-2805/06			<1:2	<1:2	<1:2	1:64	<1:2	1:64	<1:2	1:128	<1:2	1:16	1:16	<1:2
H5N1 A/turkey/Italy/21VIR9520-3/2021			<1:2	<1:2	<1:2	1:512	<1:2	1:1024	<1:2	1:8	<1:2	<1:2	1:128	<1:2
H5N5 A/wigeon/Italy/16VIR9616-3/2016			NT	NT	NT	1:256	NT	1:256	NT	1:4	NT	NT	1:32	NT
H7N1 A/African starling/England/983/79			1:2048	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	1:64	<1:2	<1:2	<1:2	1:256	1:8	<1:2
H7N7 A/turkey/England/647/77			1:2048	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	1:256	<1:2	<1:2
H9N2 A/mallard/Italy/3817-34/05			NT	1:512	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
APMV-1/dove/Italy/4400/2000			NT	NT	NT	NT	1:1024	NT	NT	NT	1:128	NT	NT	1:64
Ulster 2C			1:4	<1:2	<1:2	<1:2	1:512	<1:2	<1:2	<1:2	1:256	<1:2	<1:2	1:32

HAU = Unità emoagglutinante, N = Negativo, NT = Non testato

[^] Valore cut-off di positività nel test HI

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

Tabella S13. Risultati da test aggiuntivi.

Campione		Codice laboratorio						
ID	Tipo	L000399	L000438	L000526	L000544	L000548	L000637	L000948
S01	H7N6							negativo NDV - ELISA
S02	H9N2	positivo H9 (1:1024)			Pos H9 1:512	H9	positivo AIV no H5,H7: H9 (1:1024)	negativo NDV - ELISA
S03	Negativo							negativo NDV - ELISA
S04	H5N8			POSITIVO H5 (1:32 con H5N1 - 1:128 con H5N8)	pos H5 1:32 H5N1 pos H5 1:128 H5N8			negativo NDV - ELISA
S05§	APMV-1		positivo ND (1:256)					positivo NDV - ELISA
S06§	H5N1				pos H5 1:128 H5N1 - pos H5 1:256 H5N8			negativo NDV - ELISA
S07	Negativo							negativo NDV - ELISA
S08	H5N2				Pos H5 1:64 H5N1 pos 1:8 H5N8			negativo NDV - ELISA
S09	APMV-1		positivo ND (1:128)					positivo NDV - ELISA
S10	H7N3							negativo NDV - ELISA
S11§	H5N1						AIV H5 (neg H5N9, pos (1:16) con H5N1)	negativo NDV - ELISA
S12§	APMV-1		positivo ND (1:16)					positivo NDV - ELISA

§ Le coppie di campioni S05 e S12 e S06 e S11 sono costituite dallo stesso siero preparato a diverse diluizioni

----- Fine report finale -----