

ORGANIZZAZIONE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO AQUA

Diagnosi della rabbia (AQUA RV-D)

Nome e indirizzo del provider del "Circuito Interlaboratorio per l'Assicurazione qualità dei risultati - AQUA"	Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie Viale dell'Università 10 – 35020 LEGNARO
Nome e recapiti del responsabile del circuito AQUA RV-D	Dr.ssa Paola De Benedictis SCS5 Ricerca e innovazione Tel. 049/8084385 e-mail: pdebenedictis@izsvenezie.it
Nome e recapiti del responsabile tecnico e statistico AQUA RV-D	<u>Responsabile tecnico:</u> Barbara Zecchin SCS5 Ricerca e innovazione Tel. 049/8084387 e-mail: Bazecchin@izsvenezie.it <u>Responsabile statistico:</u> Dr.ssa Marzia Mancin Tel. 049/8084431 e-mail: mmancin@izsvenezie.it
Obiettivo e struttura del circuito	L'obiettivo del circuito interlaboratorio (CI) AQUA RV-D è di offrire uno strumento per garantire l'assicurazione qualità dei risultati e un confronto dei laboratori tra loro a livello nazionale. Il circuito è suddiviso in due schemi: (i) AQUA RV-D 1 "Identificazione del virus della rabbia/identificazione della specie mammifero ospite di infezione", indicato per la sorveglianza chiroterri, prevede l'utilizzo di metodiche biomolecolari; (ii) AQUA RV-D 2 "Isolamento ed identificazione del virus della rabbia", indicato per la sorveglianza carnivori, prevede l'utilizzo di metodiche virologiche classiche e biomolecolari.
Subappalto delle attività	Nessuna attività viene subappaltata a terzi.
Esperti tecnici esterni all'Organizzazione del circuito	Nessuno.

<p>Requisiti che permettano la partecipazione</p>	<p>In base allo schema prescelto, possono partecipare laboratori attrezzati per l'identificazione virale con i diversi metodi richiesti quando previsti: immunofluorescenza (IF), isolamento in colture cellulari, metodiche di biologia molecolare per l'identificazione di <i>Lyssavirus</i>, metodiche di biologia molecolare atte ad identificare la specie ospite di infezione.</p> <p>Il virus della rabbia è classificato nel Gruppo di rischio 3 ed indicato con doppio asterisco (**) nell'All. XLVI del D. Lgs. 09/04/2008, n° 81 che prevede che, essendo tale patogeno normalmente non veicolato dall'aria, possa essere sufficiente assicurare i livelli di contenimento ivi previsti per gli agenti del gruppo 2, qualora il personale che manipola i campioni a rischio sia stato preventivamente sottoposto a vaccinazione antirabbica.</p> <p>Il requisito minimo per partecipare al circuito è la dichiarazione, da parte del laboratorio partecipante, che il personale coinvolto nelle prove sia stato vaccinato e presenti un titolo anticorpale post vaccinale superiore a 0,5 UI/ml con verifica dello stesso effettuata da un massimo di sei mesi (D. Lgs. 9 aprile 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>
<p>Numero e tipologia di partecipanti attesi</p>	<p>I partecipanti attesi sono laboratori pubblici appartenenti alla rete di sorveglianza nazionale.</p> <p>Considerando che gli schemi sono di tipo qualitativo non è necessario un numero minimo di partecipanti.</p>
<p>Normativa e legislazione di riferimento</p>	<p>Per la gestione del Circuito Interlaboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 • UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 • UNI ISO 13528:2022 <p>Per le prove di omogeneità e stabilità:</p> <ul style="list-style-type: none"> • WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.18, "Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses)" par B.1.3.1.i e par B.1.3.2.i, 2023 • PDP VIR 034, rev. 02, Rabbia Virus: identificazione e tipizzazione di lyssavirus mediante one step RT-PCR e sequenziamento Sanger • PDP VIR 035, rev. 03, Rilevazione di RNA di Lyssavirus mediante Real time RT-PCR (rRT-PCR) • PDP DIA 175, rev. 01, Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI) <p>Per le prove accreditate secondo norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 si rimanda all'elenco prove pubblicato sul sito web di Accredia.</p>
<p>Tipologie di campioni prova</p>	<p>Nel circuito AQUA RV-D si prevede l'invio di materiali biologici (encefalo animale) contenenti diverse concentrazioni del virus della rabbia non inattivato o RNA virale, liofilizzati, identificati dalle sigle C₁ - C_n per lo schema RV-D 1 e V₁-V_n per lo schema RV-D 2.</p> <p>Ogni laboratorio riceve i pannelli relativi agli schemi per il quale si è iscritto.</p>

<p>Analisi previste e calendario di pianificazione degli invii degli schemi</p>	<p>Per l'esecuzione delle prove del circuito interlaboratorio i partecipanti dovranno applicare quanto previsto e comunicato attraverso il calendario predisposto e pubblicato annualmente sul sito Web IZSVE verso fine anno con le date per il circuito dell'anno successivo, ed eventuali nuovi schemi previsti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test di Immunofluorescenza Diretta (IF) come da WOA Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.18 par B.1.3.1.i 2023 • Isolamento del virus della rabbia in colture cellulari come da WOA Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.18 par B.1.3.2.i 2023 • Metodiche di biologia molecolare per la rilevazione di RNA di Lyssavirus codificante per la Nucleoproteina virale • Metodiche di biologia molecolare atte ad identificare la specie ospite di infezione <p>I metodi di biologia molecolare utilizzati nello schema RV-D 1 sono da considerarsi equivalenti per la successiva fase di elaborazione statistica dei risultati.</p> <p>Per quanto riguarda lo schema RV-D 2 il metodo d'elezione per l'esecuzione dello schema è la metodica di immunofluorescenza. I risultati ottenuti con l'isolamento in cellule e metodiche biomolecolari sono considerati equivalenti per la successiva fase di elaborazione statistica dei risultati.</p>
<p>Contenuto e preparazione dei campioni prova</p>	<p>I campioni prova sono costituiti da campioni positivi preparati a partire dal ceppo virale di riferimento inoculato per via intracerebrale in topi (encefali infetti) oppure mediante aggiunta di RNA virale oppure mediante aggiunta di linee cellulari infette da ceppo virale di riferimento. I campioni così ottenuti sono successivamente diluiti con encefalo non infetto (proveniente da mammifero) e non sono sottoposti a inattivazione virale. I campioni negativi sono costituiti da encefalo non infetto (proveniente da mammifero).</p>
<p>Stoccaggio e distribuzione dei campioni prova</p>	<p>I campioni liofilizzati 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 prova del circuito AQUA RV-D vengono conservati ad una temperatura di $\leq -18^{\circ}\text{C}$ e/o tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$.</p> <p>I campioni dello schema RV-D 1 vengono confezionati in imballaggi di polistirolo contenenti siberine mentre quelli dello schema RV-D 2 in idonei imballaggi contenenti ghiaccio secco. Il trasporto verso i laboratori partecipanti esterni avviene tramite corrieri autorizzati al trasporto di materiale biologico.</p>
<p>Numero di distribuzioni per anno per ogni tipologia di analisi sulla stessa matrice</p>	<p>Una distribuzione per ciascun schema, biennialmente.</p>
<p>Numero di campioni prova per schema</p>	<p>Si prevede l'invio di un minimo di 10 (max 15) campioni prova.</p>
<p>Informazioni tecniche specifiche</p>	<p>Le informazioni riguardanti i campioni prova (pubblicate in Aquaweb) sono le seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • modalità di ricostituzione, conservazione e processazione dei campioni prova; • analisi da effettuare e metodiche da utilizzare; • modalità di registrazione dei risultati tramite Aquaweb; • date di invio dei pannelli, periodo per l'esecuzione delle prove e data ultima per l'invio dei risultati; • scheda di sicurezza.

<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 dei lotti di campioni prova, analizzando, con i metodi previsti dalla tipologia di schema inviato, 3 vials per campione prova, selezionate a random dal lotto di produzione. Sui medesimi campioni viene inoltre effettuata una valutazione quantitativa dell'antigene virale attraverso la rilevazione di intensità di immunofluorescenza specifica, se questa metodica è prevista. L'omogeneità è verificata quando il 100% dei risultati ottenuti concordano con l'esito atteso, per tutte le metodiche, e l'intensità di immunofluorescenza è coerente con quanto atteso in base alla preparazione del lotto. Se il lotto non risulta omogeneo o se l'intensità di immunofluorescenza non è coerente con quanto atteso in base alla preparazione del lotto, il lotto viene eliminato.</p> <p>La stabilità viene verificata sui campioni prova nella loro confezione finale, la 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.</p> <p>Le modalità di analisi della stabilità sono analoghe a quelle dell'omogeneità: vengono testate 3 vials per campione prova selezionate a random dal lotto di produzione, per istante temporale, utilizzando i metodi previsti dalla tipologia di schema inviato.</p> <p>Nel caso sia distribuito lo schema composto da campioni prova costituiti da encefali di topo infettati sperimentalmente o campioni prova preparati in vitro utilizzando cellule infette, e le prove per la verifica della stabilità prima dell'invio dei campioni siano previste in un tempo ravvicinato alle prove di omogeneità (entro le 4 settimane), queste prove vengono considerate sia per la verifica dell'omogeneità che per la verifica della stabilità al primo istante temporale.</p> <p>La stabilità è verificata quando il 100% dei risultati ottenuti concordano con l'esito atteso per tutte le metodiche.</p>
<p>Metodi statistici utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei partecipanti</p>	<p>Per le prove qualitative di identificazione dell'antigene virale mediante IF, isolamento virale in colture cellulari, identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari e identificazione della specie ospite tramite metodiche di biologia molecolare, il valore assegnato coincide con il valore atteso che è definito dall'organizzatore del circuito, in quanto derivante dalla conoscenza della preparazione dei campioni prova da analizzare e/o dall'utilizzo di materiale di riferimento.</p> <p>Per questa tipologia di CI, non vengono fornite statistiche di sintesi come media e/o deviazione standard di risultati indicanti proprietà qualitative e informazioni quantitative in merito all'incertezza del valore assegnato in quanto non appropriate. Inoltre, non sono previste procedure statistiche per l'identificazione e gestione di valori anomali ed errori grossolani in quanto non appropriate alla tipologia di risposta richiesta dal CI. Inoltre, per i CI di tipo qualitativo non è appropriato fornire informazioni quantitative in merito all'incertezza del valore assegnato.</p> <p>L'esito di presenza/assenza fornito da ogni partecipante, viene confrontato con il valore assegnato. Per ogni misurando la performance del partecipante viene quindi valutata in termini di concordanza con il valore assegnato attraverso il calcolo della statistica K di Cohen. Tale statistica permette di 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.</p> <p>Una valutazione complessiva dello svolgimento della prova è data dal calcolo della statistica K di Fleiss (estensione della K di Cohen per m>2 partecipanti), che permette di valutare la concordanza nella tipologia di risposta, tra i laboratori che hanno eseguito la prova. Nel caso in cui alcuni laboratori non avessero eseguito l'intero pannello di analisi dei campioni inviati, si valuterà</p>

l'ipotesi di non considerarli nella valutazione complessiva. Per l'interpretazione della statistica K di Cohen e di Fleiss si rimanda alla scala di Landis & Koch riportata di seguito.

K	Concordanza
≤ 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

La prestazione dei laboratori che abbiano raggiunto almeno una concordanza buona (K=0,61-0,80) è ritenuta accettabile per il circuito interlaboratorio AQUA RV-D, sia per lo schema RV-D 1 che RV-D 2.

Tuttavia, indipendentemente dal valore di concordanza ottenuto, l'esito del circuito è considerato non favorevole per quei laboratori che abbiano fallito nell'identificazione di uno o più campioni positivi (presenza di uno o più falsi negativi), considerata la rilevanza in termini di sanità pubblica della mancata identificazione di un caso di rabbia.

Per le prove qualitative di identificazione dell'antigene virale mediante IF viene fornita una ulteriore elaborazione, non valutativa, ma informativa al fine di identificare eventuali criticità. Viene effettuata una comparazione tra la quantificazione dell'antigene virale mediante IF ottenuta dai partecipanti (valore di intensità da 1 a 4) e quella ottenuta dall'organizzatore in fase di verifica dell'omogeneità.

L'intensità di fluorescenza riportata dal partecipante è considerata "Idonea al 100%" (punteggio 1) nel caso in cui il valore di intensità riportato sia incluso nell'intervallo identificato dal range di accettabilità definito dall'organizzatore del circuito (min-max); "Idonea all'80%" (punteggio 0,8) nel caso in cui il valore di intensità di fluorescenza esca dall'intervallo identificativo del range di accettabilità (min-max) di una quantità pari a 1; "Non idonea" in tutti gli altri casi (punteggio 0).

Il punteggio complessivo ottenuto dalla somma dei punteggi parziali osservati per ogni campione analizzato, viene classificato nel seguente modo: punteggio <4 Scarso, da 5 a 7 Sufficiente, da 8 a 10 Buono, da 11 a 13 Ottimo. La quantificazione del segnale è ritenuta soddisfacente quando il punteggio complessivo è ≥8.

Emissione report

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 dello schema. Una volta pubblicato il report parziale i risultati inviati non possono più essere modificati.

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:

- caratteristiche dei campioni inviati, metodiche utilizzate per la loro preparazione e controllo dei campioni;
- 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;
- i criteri di valutazione della performance dei partecipanti;
- commenti e raccomandazioni basati sui risultati del circuito interlaboratorio.

I risultati trasmessi dai laboratori sono resi anonimi tramite i codici numerici casuali che variano da report definitivo a report definitivo e garantiscono l'assoluto anonimato nel tempo. Il codice identificativo numerico specifico del partecipante per un determinato report, viene evidenziato al cliente in

	<p>Aquaweb prima dell'apertura del report stesso e assegnato automaticamente dal gestionale Aquaweb.</p> <p>Il report finale viene pubblicato sul sito web dell'IZSVE ed in Aquaweb entro 3 mesi dal ricevimento di tutti i risultati.</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.</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>
<p>Comunicazione con i partecipanti</p>	<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 RV-D, 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. 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. 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 RV-D. 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. 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>