

ORGANIZZAZIONE DEL PROFICIENCY TESTING AQUA

Diagnosi della rabbia (AQUA RV-D)

1. Obiettivo, campo di applicazione e struttura del PT

L'obiettivo del PT AQUA RV-D è di offrire uno strumento volto a garantire l'assicurazione della qualità dei risultati e il confronto tra i laboratori partecipanti.

Il PT è strutturato in due schemi erogati in maniera simultanea e continua su base biennale:

- 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
- 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.

Per ciascuno schema è prevista una distribuzione nell'anno di esecuzione.

Ulteriori informazioni e istruzioni, incluse le date di inizio dello schema e i termini per la presentazione dei risultati, sono disponibili sul sito web IZSVe (www.izsvenezie.it) e/o nell'applicativo web dedicato Aquaweb.

2. Numero e tipologia di partecipanti attesi e requisiti per la partecipazione

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 Lyssavirus, metodiche di biologia molecolare atte ad identificare la specie ospite di infezione.

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.

Per partecipare al PT il personale del laboratorio partecipante, coinvolto nelle prove, deve essere vaccinato e avere 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).

L'Organizzatore si riserva il diritto di richiedere al Cliente/Partecipante di fornire prove comprovanti il possesso di tali requisiti ed è esente da ogni responsabilità nell'eventualità che questo fornisca dichiarazioni mendaci.

I partecipanti attesi sono laboratori pubblici appartenenti alla rete di sorveglianza nazionale.

Considerando che gli schemi sono di tipo qualitativo non è necessario un numero minimo di partecipanti.

3. Modalità di iscrizione

Il nuovo cliente può inoltrare richiesta di partecipazione compilando l'apposito modulo disponibile sul sito web dell'IZSVe. I clienti già registrati in Aquaweb possono iscriversi ad uno o più schemi offerti dal PT AQUA RV-D accedendo al gestionale con le proprie credenziali dal sito web dell'IZSVe.

All'atto dell'iscrizione, a ciascun partecipante è attribuito un codice alfanumerico univoco che consente di riportare i risultati nel report senza rivelare l'identità del partecipante che li ha trasmessi.

L'iscrizione agli schemi può essere effettuata a partire dalla data di pubblicazione sul sito web del calendario e sino al termine specificato nello stesso e comunicato via e-mail. Iscrizioni tardive saranno accettate a discrezione dell'Organizzatore, compatibilmente con la disponibilità dei campioni prova e la data prevista di esecuzione dello schema.

Si consiglia ai partecipanti di prendere parte agli schemi più appropriati rispetto al proprio ambito di analisi. Con l'iscrizione al PT AQUA RV-D il cliente accetta le condizioni generali di contratto pubblicate sul sito IZSve.

4. Tipologia di campioni prova

Per gli schemi del PT si utilizzano come campioni prova matrici diverse in base alle analisi da effettuare cercando di rispettare la natura dei campioni di routine. Ogni schema del PT prevede l'analisi di un numero di campioni prova da 10 a 15. I campioni prova sono identificati dalle sigle C1 - Cn per lo schema RV-D 1 e V1-Vn per lo schema RV-D 2.

- Schema RV-D 1: i campioni prova possono essere preparati utilizzando RNA virale o RNA sintetico, addizionato a surnatante di encefalo di mammifero non infetto e ad un medium di trasporto commerciale stabilizzante e inattivante. I campioni così ottenuti sono da considerarsi materiale non infetto e sono distribuiti in forma liquida in provette con tappo a vite nella quantità di 1 ml/campione prova.
- Schema RV-D 2: 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 o RNA sintetico, 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). I campioni sono distribuiti liofilizzati in vials in vetro sigillate mediante tappo in gomma e ghiera in alluminio.

5. Spedizione dei campioni prova

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 è affidato a corriere convenzionato con l'Organizzazione o gestito tramite servizio interno per i laboratori periferici dell'IZSve. La verifica delle condizioni e del contenuto dei pacchi deve avvenire immediatamente dopo il loro ricevimento. Eventuali anomalie su contenuto, condizioni o documentazione di accompagnamento devono essere comunicate all'Organizzatore entro cinque (5) giorni lavorativi dal ricevimento.

6. Metodi e misurandi

Il partecipante è invitato a trattare i campioni prova come campioni di routine. I metodi da applicare includono

- test di Immunofluorescenza Diretta (IF) come da WOAHP Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.19 par B.1.3.1.i 2023,
- isolamento del virus della rabbia in colture cellulari come da WOAHP Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.19 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.

I metodi di biologia molecolare utilizzati nello schema RV-D 1 sono da considerarsi equivalenti per la successiva fase di elaborazione statistica dei risultati.

Per lo schema RV-D 2 il metodo d'elezione 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.

7. Controlli di qualità

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.

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 PT.

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.

Nel caso in cui lo schema RV-D 2 preveda la distribuzione di campioni prova costituiti da encefali di topo infettati sperimentalmente o da campioni prova preparati in vitro con cellule infette, e la verifica della stabilità dei campioni prova sia programmata in un periodo ravvicinato alle prove di omogeneità (entro quattro settimane), tali prove vengono considerate valide sia ai fini della verifica dell'omogeneità e della prima stabilità. La stabilità è verificata quando il 100% dei risultati ottenuti concordano con l'esito atteso per tutte le metodiche.

I risultati dei controlli qualità sui campioni prova sono disponibili su richiesta.

Per le prove di omogeneità e stabilità:

- WOAHP Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.19, "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 2024 Rev. 2, Rabbia Virus: identificazione e tipizzazione di lyssavirus mediante one step RT-PCR e sequenziamento Sanger
- PDP VIR 035 2023 Rev. 3, Rilevazione di RNA di Lyssavirus mediante Real time RT-PCR (rRT-PCR)
- PDP DIA 175 2021 Rev. 1, Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI)

8. Invio dei risultati da parte del partecipante

I risultati sono registrati e trasmessi attraverso Aquaweb. I risultati devono essere inseriti nel formato e nelle unità di misura specificate e controllati accuratamente prima dell'invio. L'Organizzazione non può interpretare o modificare i risultati per conto dei partecipanti e nessuna modifica a questi è consentita dopo l'emissione del report. Le espressioni di risultato consentite sono 'Positivo' (P - indicativo di presenza) e 'Negativo' (N - indicativo di assenza).

Dati quantitativi e semi-quantitativi eventualmente presentati sono considerati di natura supplementare e non utilizzati per la valutazione delle prestazioni.

I risultati devono essere restituiti entro la data di scadenza indicata nelle modalità operative e/o comunicata al momento della spedizione dei pannelli. I risultati ricevuti dopo il termine non sono analizzati e pertanto non sono inclusi in alcun report.

9. Metodi statistici e criteri di valutazione utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei partecipanti

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 PT, in quanto derivante dalla conoscenza della preparazione dei campioni prova da analizzare e/o dall'utilizzo di materiale di riferimento.

Per questa tipologia di PT, 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 PT. Inoltre, per i PT di tipo qualitativo non è appropriato fornire informazioni quantitative in merito all'incertezza del valore assegnato.

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.

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 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 PT AQUA RV-D, sia per lo schema RV-D 1 che RV-D 2.

Tuttavia, indipendentemente dal valore di concordanza ottenuto, l'esito del PT 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 PT (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 .

10. Emissione report

Entro dieci (10) giorni lavorativi dalla chiusura del PT o successivo alla data in cui sono stati ricevuti i risultati di tutti i partecipanti, un report preliminare contenente la composizione dei campioni prova e il valore assegnato è reso disponibile in Aquaweb.

Il report finale è disponibile in formato elettronico entro sessanta (60) giorni lavorativi dalla chiusura dell'esercizio. Il documento è scaricabile da Aquaweb e disponibile sul sito dell'ISVe. Il report finale include rappresentazioni tabellari e/o grafiche dei risultati e delle prestazioni dei partecipanti, una descrizione dettagliata dell'approccio statistico e dei criteri di valutazione adottati. Sono inoltre riportate informazioni sulla composizione dei campioni prova, i valori assegnati e i metodi utilizzati per la loro determinazione. Una sezione del report è dedicata ai commenti dei risultati e suggerimenti per il miglioramento delle performance in caso di esiti incongruenti.

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

Indipendentemente dall'invio dei risultati, il report finale è disponibile per tutti i partecipanti iscritti al PT per consentire a coloro che non hanno rispettato il termine di invio dei risultati l'auto-valutazione delle proprie prestazioni.

11. Comunicazione con i partecipanti

Qualsiasi cambiamento nel PT in corso o l'accertata inidoneità dei campioni prova successiva alla loro distribuzione sono comunicati prontamente ai partecipanti.

Durante tutte le fasi del PT, nonché successivamente alla sua conclusione, il partecipante può contattare l'Organizzatore per richiedere chiarimenti in merito a modalità operative e istruzioni tecniche, esecuzione delle prove, valutazione delle proprie prestazioni, gestione delle non conformità a seguito di risultati insoddisfacenti o discutibili o per segnalare la perdita o il danneggiamento dei campioni prova nonché per qualsiasi altro aspetto del PT.

In caso di risultati non conformi, il partecipante può richiedere lo stesso campione utilizzato nella prova PT per la ripetizione delle analisi. Tale richiesta deve essere presentata entro due (2) mesi dalla data di emissione del report e sarà accolta compatibilmente con la disponibilità di campioni prova aggiuntivi. Per la fornitura degli stessi si applica la tariffa vigente, che verrà comunicata al momento della richiesta.

I partecipanti possono appellarsi relativamente alla valutazione della loro performance entro due (2) mesi dalla pubblicazione del report finale.

Il partecipante ha la possibilità di prendere parte all'indagine di 'Customer satisfaction' per esprimere il proprio grado di soddisfazione rispetto al servizio offerto dall'Organizzatore e a qualsiasi aspetto del PT contribuendo così al miglioramento continuo del servizio. Il sondaggio è reso disponibile al termine di ogni round ed è accessibile in una sezione dedicata di Aquaweb. Il sondaggio è condotto in forma non anonima in modo che l'Organizzatore possa eventualmente approfondire con il partecipante le motivazioni del feedback ricevuto.

Entro due (2) mesi dalla data di conclusione del sondaggio, i dati raccolti sono valutati al fine di poter operare tempestivamente azioni correttive e/o migliorative. È a discrezione dell'Organizzatore rendere o meno noto ai partecipanti l'esito dell'indagine.