

# **ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

## **Programma nazionale di valutazione esterna della qualità del test NAT per la ricerca di HCV-RNA presso i Servizi Trasfusionali**

### **Attività e risultati 2002-2005**

Angela Candido (a), Alessandra Barca (b), Paola Chionne (a), Stefano Dettori (a),  
Luisa Milazzo (b), Stefania Taffon (a), Elisabetta Madonna (a),  
Romina Tomasetto (a), Giacinta Antonini (a), Sebastiano Di Biase (c),  
Hamisa Jane Hassan (b), Maria Rapicetta (a)

*(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) MeriGen, Laboratorio di Biologia Molecolare, Napoli*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**07/6**

Istituto Superiore di Sanità

**Programma nazionale di valutazione esterna della qualità del test NAT per la ricerca di HCV-RNA presso i Servizi Trasfusionali. Attività e risultati 2002-2005.**

Angela Candido, Alessandra Barca, Paola Chionne, Stefano Dettori, Luisa Milazzo, Stefania Taffon, Elisabetta Madonna, Romina Tomasetto, Giacinta Antonini, Sebastiano Di Biase, Hamisa Jane Hassan, Maria Rapicetta  
2007, 42 p. Rapporti ISTISAN 07/6

Scopo del programma è quello di valutare la capacità dei Servizi Trasfusionali italiani nella corretta esecuzione dei test NAT (*Nucleic acid Amplification Technology*) per la ricerca di HCV-RNA, in condizioni routinarie. I dati riportati coprono il periodo dal 2002 al 2005. Ad ogni invio ciascun Servizio ha ricevuto un pannello costituito da 8 sieri umani, sia negativi che con differente titolo virale di HCV-RNA. Ai Servizi è stato richiesto di saggiare il pannello applicando le stesse procedure che vengono utilizzate nella routine giornaliera, e di spedire i risultati ottenuti all'Istituto Superiore di Sanità. Nel corso dei quattro anni del controllo la correttezza di identificazione dei campioni negativi si è mantenuta costante e a livelli piuttosto elevati. Per ciò che riguarda i campioni HCV-RNA positivi i valori di correttezza di classificazione sono migliorati nel corso dei diversi invii.

*Parole chiave:* Controllo di qualità, HCV-RNA, NAT, Servizi Trasfusionali

Istituto Superiore di Sanità

**National Programme of External Quality Evaluation in Transfusional Services for HCV-RNA NAT tests. Activity and results 2002-2005.**

Angela Candido, Alessandra Barca, Paola Chionne, Stefano Dettori, Luisa Milazzo, Stefania Taffon, Elisabetta Madonna, Romina Tomasetto, Giacinta Antonini, Sebastiano Di Biase, Hamisa Jane Hassan, Maria Rapicetta  
2007, 42 p. Rapporti ISTISAN 07/6 (in Italian)

The aim of the programme is to evaluate HCV-RNA NAT test (*Nucleic acid Amplification Technology*) performances from Italian Transfusional Services participating in the external quality evaluation program. During the evaluation period (from 2002 to 2005) each Service received human sera panels composed by titred HCV positive samples and HCV negative samples. Transfusional Services were asked to test the panels applying the same procedures normally used on a daily-routine, and to send their results to the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy). During the four years of the evaluation period the correct identification of negative samples was constantly observed with high level of compliance. Regarding positive samples the correct identification level was progressively improved.

*Key words:* Quality control, HCV-RNA, NAT, Transfusional Centres

Si ringraziano Flavia Chiarotti per la consulenza statistica e Roberto Gilardi per il lavoro di elaborazione grafica.

Il lavoro è stato finanziato dai seguenti progetti ISS di cui Maria Rapicetta è Responsabile Scientifico:

“Valutazione e validazione dei metodi di screening e di diagnosi nelle infezioni da virus HBV, HCV, varianti virali e nuovi agenti eziologici di epatiti virali” (Prog. 0T2/C).

“Valutazione e validazione delle metodologie per lo screening e le diagnosi delle infezioni da virus epatitici con particolare riferimento alle infezioni da varianti virali e da agenti eziologici di nuova caratterizzazione” (Prog. C3ND).

Per informazioni su questo documento rivolgersi a: [maria.rapicetta@iss.it](mailto:maria.rapicetta@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Candido A, Barca A, Chionne P, Dettori S, Milazzo L, Taffon S, Madonna E, Tomasetto R, Antonini G, Di Biase S, Hassan HJ, Rapicetta M. *Programma nazionale di valutazione esterna della qualità del test NAT per la ricerca di HCV-RNA presso i Servizi Trasfusionali. Attività e risultati 2002-2005*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/6).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2007

# INDICE

<b>Quadro di riferimento</b> .....	1
Obiettivi del Controllo di qualità esterno.....	1
Le Linee Guida PA/PH/OMCL (98)22.....	3
<b>Materiali e metodi</b> .....	5
Randomizzazione dei campioni .....	5
Identificazione di campioni HCV-RNA positivi per la preparazione dei pannelli.....	5
Preparazione dei pannelli.....	6
<b>Distribuzione dei campioni</b> .....	7
Predisposizione del confezionamento .....	7
Spedizione .....	7
Descrizione della modulistica .....	7
Valutazioni effettuate nel Laboratorio di riferimento dell'ISS .....	8
Elaborazione dati .....	8
Kit utilizzati nello studio.....	9
<b>Risultati</b> .....	12
Partecipazione al programma di VEQ .....	12
Correttezza di classificazione dei campioni (accuratezza).....	13
Campioni HCV negativi .....	13
Campioni HCV positivi .....	13
Riproducibilità .....	17
<b>Discussione</b> .....	19
<b>Bibliografia</b> .....	22
<b>Appendice A</b> .....	
Modulistica allegata all'invio dei campioni.....	25
<b>Appendice B</b> .....	
Rapporto conclusivo sulla elaborazione dati .....	31
<b>Appendice C</b> .....	
Elenco dei laboratori partecipanti .....	39



## QUADRO DI RIFERIMENTO

I programmi di controllo di qualità sono ormai entrati da molti anni nella pratica routinaria del laboratorio di chimica clinica (1-4). Essi includono sia schemi di valutazione interna che schemi di valutazione esterna di qualità e, almeno per quanto riguarda gli aspetti di carattere generale, hanno caratteristiche simili per le diverse discipline.

L'attivazione di programmi di controlli di qualità interni (CQI) è comunque sempre prevista dalla "Buona Pratica di Laboratorio" ed è un requisito indispensabile per l'accreditamento e la certificazione.

Il CQI consente di evidenziare errori analitici, di classificarli (causali e sistematici) e di attivare sistemi per prevenirli.

La valutazione esterna di qualità (VEQ) viene attuata da istituzioni qualificate esterne e permette di confrontare risultati ottenuti su uno stesso campione in laboratori diversi. Il singolo laboratorio può misurare la propria prestazione confrontandola con quella degli altri partecipanti ed effettuare così una propria autovalutazione al fine di poter riesaminare le proprie procedure operative ed eventualmente attivare le misure correttive più appropriate.

I programmi di controllo di qualità esterno possono essere schematicamente riassunti in:

- identificazione della tipologia dei campioni per i pannelli;
- preparazione dei pannelli;
- distribuzione dei campioni;
- esecuzione dei test nel singolo laboratorio;
- invio della risposte al laboratorio di riferimento;
- analisi statistica dei risultati;
- invio in tempi brevi dei risultati ai laboratori partecipanti.

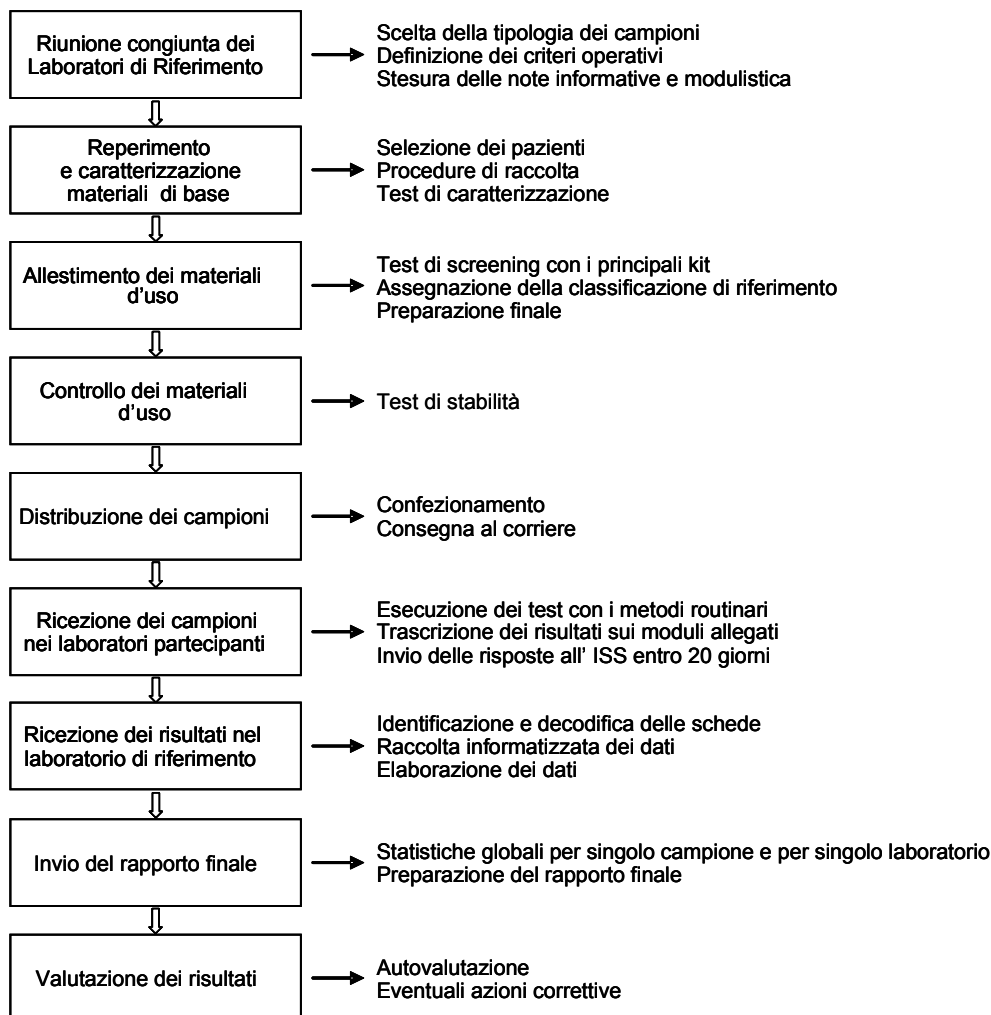
Le diverse fasi operative di un programma di VEQ sono schematicamente riassunte nell'algoritmo in Figura 1 (5).

## Obiettivi del Controllo di qualità esterno

La trasfusione è, ancora oggi, non esente da rischi di natura infettiva: sebbene la letteratura scientifica degli ultimi anni indichi che la probabilità di contrarre un'infezione da virus delle epatiti B e C (HBV e HCV) e da virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV) associata a trasfusione, è stata drasticamente ridotta, grazie anche all'aumentata sensibilità delle metodiche applicate nella validazione biologica delle unità donate.

I dati più recenti relativi ai donatori italiani (6), raccolti ed elaborati dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e riferiti allo screening delle donazioni con metodiche immunoenzimatiche, documentano infatti valori pari a 1:524.000 per HIV, 1:160.000 per HCV, 1:15.000 per HBV. In particolare per l'HCV l'uso di tecniche più sensibili, quale l'amplificazione del genoma virale consente di ridurre da 70 a 12-14 giorni la "fase finestra" con riduzione del rischio. Il rischio residuo di infezione da HCV ha determinato l'emanazione della Raccomandazione CPMP/BWP/390/97 (7), da parte dell'EMA (Agenzia Europea di Valutazione dei Medicinali), che obbliga ad eseguire la ricerca dell'HCV-RNA nei pool di plasma destinati alla produzione di emoderivati. Il legislatore italiano, ha recepito tale raccomandazione (8) ed ha poi esteso a tutte le donazioni di sangue intero e singoli emocomponenti l'obbligo di esecuzione dello screening dell'HCV-RNA basato sulle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (*Nucleic*

*acid Amplification Technology*, NAT) (9,10). Tali metodi costituiscono attualmente lo strumento tecnico in grado di ridurre l'intervallo di tempo in cui può essere identificato il donatore positivo, aumentando la sicurezza delle donazioni: è stato, infatti, dimostrato che la loro introduzione a livello routinario è in grado di ridurre il rischio di infezione post-trasfusionale da HCV di oltre l'80% (11,12).



**Figura 1. Schema operativo del programma di VEQ**

Sulla base di questi presupposti e nell'ambito delle competenze attribuite dalla normativa vigente, è stato affidato all'ISS il compito di definire i requisiti tecnico-scientifici di tali saggi, nonché l'organizzazione di programmi di valutazione esterna di qualità, al fine di assicurare anche agli emocomponenti lo stesso livello di sicurezza del plasma utilizzato per la produzione di emoderivati. Per rispondere a tali compiti è stato inizialmente condotto uno studio pilota di fattibilità volto a verificare l'applicabilità del saggio NAT per HCV-RNA nello screening dei donatori di sangue (13). I risultati dello studio hanno evidenziato che tale tecnica – per l'elevato livello di sensibilità – costituiva il metodo di elezione a fronte, tuttavia, di un cospicuo

investimento economico: l'introduzione della NAT poteva arrecare benefici solo attraverso la centralizzazione delle indagini a livello locale. La circolare 14/2001, ha accolto tale risultato e demandato alle Regioni e Province Autonome il compito di individuare, sulla base delle proprie esigenze e risorse, la ST da autorizzare per l'esecuzione delle analisi e il loro rispettivo bacino di afferenza. Ha inoltre stabilito:

- i criteri di autorizzazione dei Laboratori;
- la definizione delle procedure operative e della manipolazione dei campioni;
- la definizione dei criteri di valutazione dei risultati e relativi algoritmi di interpretazione;
- la definizione dei pannelli di riferimento e dei controlli interni;
- la definizione dell'organizzazione del *proficiency test* interlaboratori.

Entro i tempi previsti dalla circolare, le Regioni e Province Autonome italiane – mediante gli Assessorati alla Sanità e i Centri regionali di Coordinamento e Compensazione (CRCC) – hanno provveduto ad identificare le strutture idonee all'esecuzione del test: ne sono state autorizzate 110 (35,6%) tra le 326 ST ufficialmente censite in Italia dall'ISS nel 2005 (14), con una distribuzione variabile sul territorio nazionale: in alcune Regioni, infatti, è stato possibile raggiungere una notevole centralizzazione (Lazio, Marche, Toscana), in altre si è osservata una maggiore frammentazione (Piemonte, Puglia, Veneto).

Per garantire uniformità di sicurezza degli emocomponenti sul territorio nazionale è stato sviluppato, come prevedeva la Circolare, un programma di valutazione esterna di qualità, da parte dell'ISS. Il programma è stato avviato nel 2002.

## Le Linee Guida PA/PH/OMCL (98)22

Per consentire l'introduzione delle metodiche NAT nelle industrie produttrici di plasmaderivati l'*European Department for the Quality of Medicines* (EDQM), al quale fanno capo sia il Network degli OMCLs (Laboratori Ufficiali di Controllo) sia la Farmacopea Europea, un gruppo di esperti ha elaborato Linee Guida per la validazione di queste metodiche. Il documento fornisce uno schema preciso del protocollo di validazione di un metodo per la rilevazione dell'HCV-RNA indicando i parametri essenziali da definire:

1. La specificità, intesa come la capacità di rilevare inequivocabilmente l'acido nucleico bersaglio in presenza di altri componenti.
2. Il limite di rilevazione, inteso come quantità minima di acido nucleico in grado di essere rilevata in un campione.
3. La robustezza, intesa come la capacità della procedura di restare inalterata nonostante piccoli cambiamenti nei parametri di reazione; deve essere assicurata la prevenzione della cross-contaminazione, intesa come l'affidabilità nel sottoporre a indagine campioni positivi e negativi senza contaminare quest'ultimi, producendo falsi risultati positivi.

La specificità e la robustezza della metodica nel caso di impiego di test commerciali sono, di fatto, già valutati dalla stessa ditta produttrice del test. Tuttavia, una conferma della specificità può essere effettuata testando almeno 100 plasma pool già risultati negativi e utilizzando una tecnica diversa da quella in fase di validazione. Inoltre, l'uso di appositi pannelli può consentire anche di verificare se la metodica utilizzata sia in grado di rilevare i diversi genotipi dell'HCV.

Per determinare la sensibilità dei metodi NAT applicati alla ricerca dei genomi virali nel plasma è necessario utilizzare campioni positivi a titolo noto. Il NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*) ha reso disponibili gli standard per i virus più rilevanti in campo trasfusionale (15-19). È stata quindi scelta come riferimento internazionale WHO la preparazione (96/790), cui è stata arbitrariamente assegnata una concentrazione di  $10^5$  UI/mL

(20). Dal 1997 numerose altre preparazioni sono state preparate e calibrate rispetto allo standard internazionale quali: NIBSC reagent 96/586; PEI HCV; ISS HCV-RNA reagent 0498 e 0102 (21); CBER/FDA HCV-RNA; CLB Pelispy run control.

Il parametro che è essenziale definire è il limite di rilevazione o *cut-off*, che, come indicato dalla Farmacopea, è il numero minimo di sequenze target rilevabili nel 95% dei test eseguiti. Diluizioni seriali di uno standard, quello del WHO o una preparazione calibrata contro lo standard del WHO, devono essere testate in sedute analitiche diverse per un totale di 24 repliche per ciascuna diluizione. Il *cut-off* deve essere calcolato mediante opportuna analisi statistica (analisi probit).

Nell'ambito dell'assicurazione della qualità la formazione degli operatori prevede un adeguato programma di qualificazione.



## MATERIALI E METODI

L'arruolamento dei Servizi Trasfusionali (ST) ha previsto un'indagine conoscitiva preliminare, svolta con la collaborazione di tutti i Centri Regionali di Coordinamento e Compensazione (CRCC), mirata all'identificazione delle ST autorizzate per l'esecuzione della ricerca di HCV-RNA con la NAT.

Quest'ultime sono state invitate a partecipare al Programma, previa compilazione di una scheda anagrafica e di un questionario inerente le metodiche utilizzate, l'organizzazione del laboratorio, il personale dedicato, in modo da poter appropriatamente valutare il dimensionamento degli invii.

### Randomizzazione dei campioni

Lo schema ha previsto l'invio di pannelli da 8 campioni alle ST aderenti al Programma, alle quali è stata raccomandata l'adozione di procedure e metodi abitualmente in uso nella propria pratica routinaria e la restituzione dei risultati ottenuti, registrati sugli appositi moduli forniti con i campioni, entro 20 giorni.

Al fine di prevenire il riconoscimento dei campioni tra i diversi laboratori partecipanti, è stato adottato un sistema di codifica randomizzata con l'attribuzione di etichette numeriche differenti e specifiche per ciascun pool di campioni.

L'algoritmo di decodifica dei campioni era noto solo all'ISS: ciò ha consentito, quindi, la possibilità di valutare la riproducibilità intra-saggio dei dati analitici proponendo, nello stesso invio, campioni uguali in duplicato, contraddistinti da diverso codice.

### Identificazione di campioni HCV-RNA positivi per la preparazione dei pannelli

I campioni sono stati preparati dalla ditta MeriGen Lab. C. Pandolfi & C. s.a.s.

Le preparazioni HCV-RNA positive sono state ottenute a partire da campioni di sangue prelevati da volontari previo consenso informato. Su tali preparazioni sono stati eseguiti i seguenti saggi:

- HCV Ab
- Determinazione dell'HCV-RNA qualitativa
- Genotipizzazione della regione core (mediante nested PCR)
- Genotipizzazione della regione 5'UTR (mediante sequenza diretta del prodotto di PCR, ottenuto in PCR qualitativa)
- Determinazione quantitativa della viremia mediante Limiting Dilution PCR e rilevazione in Elettroforesi Capillare
- Determinazione della viremia mediante Real Time PCR

La determinazione della viremia è stata calcolata sulla media di tre esperimenti quantitativi condotti su tre diluizioni del campione contro una curva di calibrazione da 100 a 100.000 UI/mL.

Come campione di riferimento nei saggi quantitativi è stato utilizzato lo standard WHO 96/790.

In base alla viremia determinata e al titolo previsto per i campioni che dovranno comporre il

pannello, sono stati calcolati gli opportuni fattori di diluizione.

Successivamente alla preparazione, il titolo dei campioni diluiti viene riverificato mediante Real-Time PCR.

Per la preparazione dei campioni negativi sono stati utilizzati controlli negativi per HCV-Ab e HCV-RNA.

## Preparazione dei pannelli

La procedura di preparazione dei campioni componenti il pannello ha previsto le seguenti fasi:

*1. Selezione dei campioni*

Campioni HCV-RNA positivi, con una viremia superiore a  $10^7$  UI/mL identificati come genotipo di interesse sono stati utilizzati per la preparazione dei pannelli.

*2. Preparazione dei campioni negativi e del diluente*

Dalle donazioni HCV negative si ottiene il criosupernatante utilizzato per la preparazione dei campioni negativi del pannello e come diluente nella preparazione dei campioni positivi.

*3. Preparazione dei campioni positivi*

Il criosupernatante negativo è stato opportunamente miscelato con un'aliquota di campione positivo fino ad ottenere il titolo previsto per un volume finale di almeno 200 mL. Il plasma risultante è stato sottoposto ad agitazione continua per almeno 30 min a 4 °C, prima di procedere al suo stoccaggio in aliquote da 1 mL, in tubi sterili con tappo a vite da 2 mL, idonei alla procedura di arricchimento per centrifugazione.

*4. Conservazione e archivio storico dei campioni*

Tutti i campioni sono conservati a -80 °C fino alla spedizione. Aliquote random dei singoli campioni sono state destinate al controllo di qualità. Per ogni lotto di prodotto vengono conservate dieci aliquote.

Nella Tabella 1 sono riportate le tipologie dei campioni positivi utilizzati.

**Tabella 1. Tipologia dei campioni positivi inviati**

Invio	Anno	N. ST partecipanti	Concentrazione UI/mL	Genotipo
1	2002	89	1000 100	1b
2	2002	89	500 100	2c
3	2003	89	500 100 50	1b
4	2003	93	500 100 50	1b
5	2003	94	500 100 50	2c
6	2004	95	170* 35* 25*	3a
7	2005	99	500 100 75	3a

\* valori di *retesting*

## **DISTRIBUZIONE DEI CAMPIONI**

### **Predisposizione del confezionamento**

I campioni aliquotati ed etichettati con indicazione del lotto di produzione, data di confezionamento e data di scadenza, sono stati sigillati in plastica e disposti in contenitori idonei al trasporto di materiale biologico, secondo la normativa vigente.

Poiché si tratta di campioni con potenzialità infettiva le procedure di confezionamento e spedizione sono conformi alle direttive stabilite secondo ICAO/IATA Packing Instruction n. 602-904 che comprendono anche il trasporto a temperatura controllata in ghiaccio secco.

I campioni di plasma etichettati (con etichette adeguate alla conservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) e identificati sono stati collezionati in aliquote da 1 mL in tubi in polipropilene con tappo a vite e o-ring di tenuta idonei alla eventuale procedura di arricchimento. Successivamente sigillati in bustine di plastica a bolle contenenti carta assorbente sufficiente a trattenere 2 mL di liquido.

Le bustine sigillate sono state confezionate successivamente in un contenitore in cartone con indicazione evidente di “Infectious substances” e i riferimenti (nome e n. telefonico) del responsabile da contattare in caso di rottura e fuoriuscita del materiale biologico. È stata inserita una scheda di sicurezza del prodotto. Il contenitore esterno sigillato in busta è stato inserito in una scatola in polistirolo contenente 4 kg di ghiaccio secco.

### **Spedizione**

La spedizione è stata eseguita ai Centri partecipanti al programma di VEQ, con consegne garantite in 24 ore dalla spedizione. Ogni confezionamento è stato garantito per almeno 48 ore. La catena del freddo è stata controllata mediante l'aggiunta di un indicatore “Freeze Thaw” corredato di apposita scheda.

### **Descrizione della modulistica**

All'interno della confezione sono inserite le Note Informative e la scheda di risposta per l'invio dei dati all'ISS (Appendice A – Modulistica allegata all'invio dei campioni)

Le Note Informative contenevano le seguenti notizie:

- natura dei campioni
- modalità di conservazione
- indicazioni sull'esecuzione dei saggi
- indicazioni sulla compilazione del modulo di risposta
- procedura per l'invio dei risultati

Le informazioni richieste nella scheda di risposta erano:

- data arrivo campioni
- data esecuzione saggio
- kit utilizzato, ditta produttrice, numero di lotto e scadenza
- valori dei controlli positivo e negativo
- codice del campione con la classificazione e i valori di od/rlu (sia dei campioni che dei controlli interni)

## Valutazioni effettuate nel Laboratorio di riferimento dell'ISS

Prima di procedere alla spedizione, una confezione del pannello preparato dalla ditta è stato analizzato presso il laboratorio di riferimento dell'ISS per valutare l'appropriatezza della matrice e la congruità della classificazione finale.

Il pannello degli otto campioni è stato testato con i due kit disponibili in commercio. Sono state preparate diluizioni seriali dei campioni HCV-RNA positivi e dello standard di riferimento ISS 0498 ed è stata valutata la corrispondenza con i risultati inviati dalla ditta che ha preparato i campioni.

## Elaborazione dati

L'ISS ha provveduto all'inserimento e all'elaborazione dei dati utilizzando un apposito *software* in ambiente Access, appositamente progettato, che si articola in:

1. Database relazionale dei dati relativi a laboratori partecipanti, campioni impiegati, invii eseguiti, campioni coinvolti in ogni invio, schede trasmesse dai laboratori, metodi di analisi e controllo dei dati ricevuti.
2. Immissione dei dati tramite una interfaccia costituita da apposite maschere che ha consentito il controllo simultaneo dei dati tramite matrici specifiche per ogni tipo di kit. Le schede sono state inserite in due parti distinte: la prima recante i dati generali, (codice del laboratorio, kit impiegato, data di esecuzione del test e valori dei controlli). La seconda con i risultati delle analisi eseguite su ogni campione. Il programma memorizza nel database i dati relativi ad ogni analisi riportata, esegue un primo controllo dei dati inseriti e opera un confronto tra i valori quantitativi ottenuti per ciascun campione e la classificazione finale di questi ultimi, indicata dal ST, riportando tale parametro in un apposito campo chiamato "classificazione coerente". La classificazione coerente risente ovviamente dei dati indicati nei materiali di controllo usati dal laboratorio e presenti in ogni kit, e nella correttezza degli stessi. La correttezza di classificazione, valutata per confronto tra la classificazione finale, fornita dal ST, con la classificazione di riferimento dei campioni, nota all'ISS, ha permesso di valutare la performance globale del singolo ST
3. Stampa dell'elaborato finale, comprendente:
  - una scheda individuale per ciascun partecipante, in cui sono stati riportati tutti i risultati da esso inviati per lo specifico invio e in cui sono state opportunamente evidenziate le non conformità eventualmente individuate;
  - una scheda di valutazione globale per singolo campione, comune a tutti i partecipanti, comprendente i risultati cumulativi ottenuti da tutti i ST per ogni campione inviato, sia relativa alla classificazione finale che a quella coerente.

Il rapporto finale (Appendice B) inviato dall'ISS a tutti i ST partecipanti comprende:

- una lettera in cui è stato riassunto il materiale contenuto nell'elaborato, con particolare attenzione alle principali non conformità rilevate (Allegato B1);
- le Note Esplicative per la corretta interpretazione dell'elaborato, nelle quali sono stati riportati i criteri di classificazione (Allegato B2);
- la scheda individuale del singolo ST
- una scheda di valutazione globale dei risultati per singolo campione (Allegato B3);
- un elenco dei risultati ottenuti nei laboratori di riferimento (Allegato B4).

In tal modo ogni ST ha potuto valutare la propria prestazione rispetto a quella degli altri partecipanti rendendo possibile l'individuazione di eventuali non conformità e l'adozione di tempestive misure correttive.

## Kit utilizzati nello studio

Lo sviluppo di tecniche di biologia molecolare, e in particolare la NAT, si è mostrata uno strumento prezioso sia nel campo della ricerca che in quello della diagnostica. La potenzialità di queste tecniche ha permesso lo sviluppo di kit diagnostici i quali utilizzano diverse tecniche molecolari, che offrono contemporaneamente il vantaggio di una rilevazione diretta del virus e di una sensibilità più elevata di quella dei metodi immunoenzimatici (22-24).

I due kit diagnostici, autorizzati al commercio in Italia per lo screening di HCV-RNA sulle unità di sangue e utilizzati nello studio sono: Roche Cobas Ampliscreen e Chiron-Procleix

### **Roche Cobas Ampliscreen HCV test v.2.0**

Test qualitativo in vitro per la rilevazione diretta dell'RNA del virus dell'epatite C nel plasma umano. Il test è basato sulla trascrizione inversa dell'RNA bersaglio per generare un DNA complementare, sull'amplificazione e ibridazione dell'acido nucleico bersaglio cDNA tramite reazione polimerasica a catena, al fine di rivelare la possibile presenza dell'RNA dell'HCV nel plasma.

Il test Cobas Ampliscreen HCV v. 2.0, prevede cinque fasi principali:

- preparazione dei campioni;
- trascrizione inversa dell'RNA bersaglio per generare un DNA complementare;
- amplificazione tramite PCR del cDNA bersaglio usando primer complementari specifici all'HCV;
- ibridazione dei prodotti amplificati con sonde oligonucleotidiche specifiche al bersaglio;
- rilevazione dei prodotti amplificati legati alla sonda tramite determinazione colorimetrica.

#### *Preparazione dei campioni*

Il test prevede due procedure di trattamento dei campioni, la procedura multipreparato e quella standard. La procedura multipreparato viene usata per testare pool di plasma prelevati da un massimo di 24 donatori. La procedura standard viene utilizzata per analizzare campioni individuali.

La procedura standard di trattamento dei campioni prevede l'isolamento diretto dal plasma dell'RNA dell'HCV tramite lisi delle particelle virali indotta da un agente caotropico, seguita da precipitazione dell'RNA in alcool. La procedura multipreparato prevede invece la sedimentazione delle particelle virali dell'HCV tramite centrifugazione ad alta velocità del plasma, seguita da lisi del pellet virale tramite un agente caotropico e da precipitazione dell'RNA in alcool. Il controllo interno HCV viene introdotto in ciascun campione con il reagente di lisi multipreparato e funge da controllo dell'estrazione e dell'amplificazione di ciascun campione e controllo trattato.

Il controllo interno HCV è stato aggiunto al test COBAS Ampliscreen HCV per consentire di identificare i campioni trattati che contengano sostanze potenzialmente interferenti con l'amplificazione tramite PCR. Tale controllo è un trascritto di RNA con regioni di legame per i primer identiche a quelle della sequenza HCV bersaglio, una sequenza interna randomizzata di lunghezza e composizione di basi simile alla sequenza HCV bersaglio e una regione unica di

legame della sonda che differenzia l'amplicon del controllo interno HCV dall'amplicon bersaglio.

#### *Trascrizione inversa e amplificazione mediante PCR*

Nel test vengono utilizzati due primer che identificano una sequenza di 244 nucleotidi all'interno della regione 5' non tradotta altamente conservata del genoma HCV. Le reazioni di trascrizione inversa e di amplificazione vengono svolte tramite DNA polimerasi dell'enzima ricombinante termostabile *Thermus thermophilus*. In presenza di manganese e nelle appropriate condizioni di temperatura l'enzima svolge attività sia di trascrittasi inversa che di DNA polimerasi. Ciò consente la trascrizione inversa e l'amplificazione PCR nella stessa provetta di reazione. Vengono quindi prodotti ampliconi specifici biotinilati (in quanto uno dei primer è biotinilato), l'uso dell'enzima Amperase consente l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico bersaglio del campione.

Dopo l'amplificazione tramite PCR il campione viene denaturato in modo da formare DNA a singolo filamento; aliquote di ampliconi vengono messe in contatto con delle particelle magnetiche rivestite con una sonda oligonucleotidica specifica all'amplicon dell'HCV o all'amplicon del controllo interno, l'aggiunta del coniugato di avidina perossidasi di rafano e del substrato (TMB) permette di evidenziare gli ampliconi tramite formazione di un complesso colorato, la cui assorbanza viene misurata ad una lunghezza d'onda di 660 nm.

Dall'amplificazione in poi tutti i processi vengono eseguiti dallo strumento COBAS Amplicor.

### **Chiron-Procleix HIV-1/HCV e Chiron Procleix Ultrio Assay**

I test Chiron sono basati su tre processi principali che avvengono in un'unica provetta:

- preparazione del campione;
- amplificazione mediata dalla trascrizione dell'RNA bersaglio (TMA);
- rilevazione dei prodotti di amplificazione mediante il test di protezione dell'ibridazione (HPA).

#### *Preparazione del campione*

L'acido nucleico virale viene isolato dai campioni di plasma mediante un sistema di cattura del bersaglio, tramite un "Reagente di cattura del Target" (TCR). Il plasma viene trattato con un detergente per solubilizzare l'involucro virale, denaturare le proteine e rilasciare l'acido nucleico virale. Oligonucleotidi di cattura omologhi a regioni altamente conservate di HIV-1, HCV e HBV vengono ibridati con l'acido nucleico bersaglio.

Il bersaglio ibridato viene, quindi, catturato su microparticelle magnetiche le quali vengono separate dal plasma tramite un campo magnetico. Per la rimozione dei componenti plasmatici dalla provetta di reazione, si eseguono lavaggi successivi. La separazione magnetica e le operazioni di lavaggio vengono eseguite tramite un sistema dedicato, denominato TCS (target Capture System). Un controllo interno, costituito da RNA trascritto viene aggiunto a ciascuna reazione insieme al reagente di cattura: in questo modo vengono controllate tutte le fasi della procedura.

#### *Amplificazione mediata dalla trascrizione (TMA)*

Il TMA è un metodo di amplificazione del target basato sulla trascrizione, che utilizza due enzimi, la transcriptasi inversa MMLV e la T7 RNA polimerasi. La transcriptasi inversa produce un DNA copia della sequenza target, contenente una sequenza promotore per la T7 RNA polimerasi. La T7 RNA polimerasi riconosce la sequenza promotor nella molecola di DNA e comincia la trascrizione, producendo numerose copie di RNA sullo stampo del DNA copia. La

reazione che è autocatalitica e avviene alla temperatura di 41,5 °C, viene preceduta da una breve incubazione a 60 °C per permettere l'ibridazione dei primers.

*Rilevazione mediante test di protezione dell'ibridazione (HPA)*

La rilevazione mediante HPA consiste nell'ibridazione dell'amplificato con sonde a singola elica ad esso complementari marcate con estere di acridinio, e, quindi, chemoluminescenti.

Per distinguere tra sonde ibridate e non, viene impiegato un reagente di selezione che innesca un processo di idrolisi delle sonde "non protette" dal legame con l'acido nucleico. Lo *step* finale è quello dell'introduzione dei tubi di reazione in un luminometro, il quale automaticamente distribuisce i reagenti appropriati per produrre e rilevare il segnale chemoluminescente. Il segnale del controllo interno si differenzia da quello specifico di HIV-1, HCV e HBV attraverso una cinetica differenziale di emissione della luce proveniente da sonde marcate in maniera diversa.

## RISULTATI

### Partecipazione al programma di VEQ

Il programma di VEQ è stato svolto nel periodo 2002-2004. Il numero dei centri partecipanti è stato di 89 nel 2002 e 99 nell'ultimo invio del 2005 (Appendice C). La distribuzione geografica delle ST arruolate e la copertura rispetto alle ST censite è ripartita in Figura 2.



**Figura 2. Distribuzione geografica e percentuale di copertura dei centri partecipanti**

Presso tali ST, per il rilevamento di HCV-RNA, è stato utilizzato uniformemente per tutti gli invii, per il 76,9% il Cobas Ampliscreen HCV Test (Roche Diagnostics) e per il 23,1% il kit Chiron Procleix HIV-1/HCV.



## Correttezza di classificazione dei campioni (accuratezza)

L'analisi dell'accuratezza definita come concordanza tra il valore rilevato dal laboratorio partecipante e quello dei laboratori di riferimento, è stata eseguita per i quattro anni di svolgimento del programma.

### Campioni HCV negativi

La capacità di corretta identificazione dei campioni negativi è stata elevata in tutti gli invii, con una media del 99%. In Figura 3 sono riportati i valori percentuali dei campioni falsi positivi (FP) riferiti ad ciascun invio effettuato.

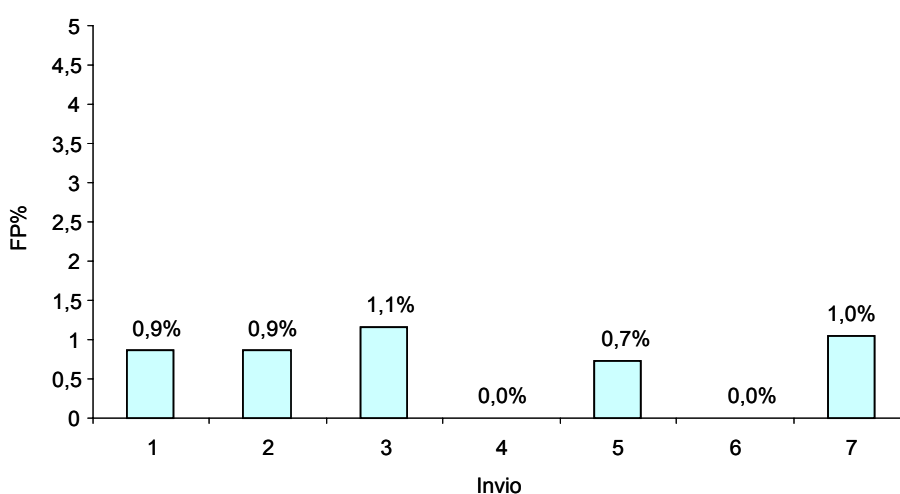


Figura 3. Campioni falsi positivi

### Campioni HCV positivi

Per i campioni positivi sono state eseguite tre diverse tipologie di analisi dei dati:

- 1) Valutazione dei risultati in relazione al titolo virale nei differenti invii.
- 2) Valutazione globale dei risultati in relazione al titolo virale.
- 3) Valutazione dei risultati in relazione al genotipo virale.

#### Valutazione dei risultati in relazione al titolo virale nei differenti invii

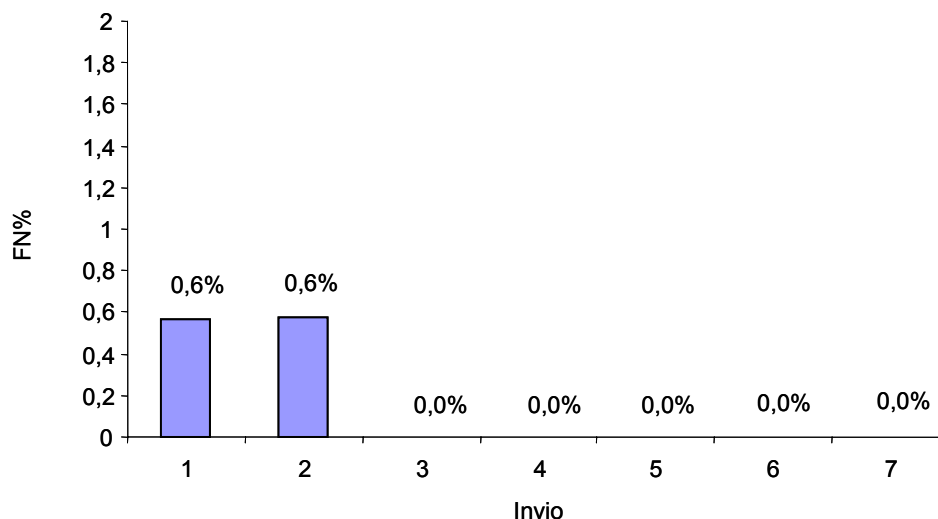
È stato analizzato l'andamento della correttezza di classificazione dei campioni al fine di monitorare le performance dei laboratori.

I campioni sono stati raggruppati in tre classi sulla base del titolo virale: campioni con titolo compreso tra 1000 e 170 UI/mL; tra 100 e 75 UI/mL; e campioni tra 50 e 25 UI/mL.

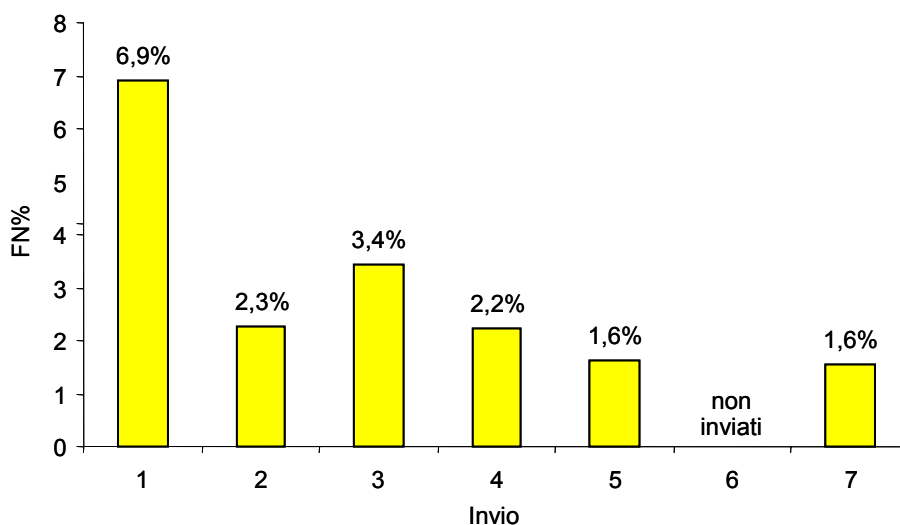
Sono state calcolate le percentuali di falsi negativi (FN) relative ai tre gruppi di campioni per ciascun invio.

Si è evidenziato che per i campioni ad alto titolo (1000-170 UI/mL) la percentuale di FN è stata molto bassa ed è limitata esclusivamente ai primi due invii di cui un campione da 1000 UI/mL al primo invio (0,6%), e un campione da 500 UI/mL (0,6%) al secondo invio (Figura 4).

Fra i campioni a titolo compreso tra 100 e 75 UI/mL la percentuale di FN ha presentato l'andamento mostrato in Figura 5, dove è stata osservata una maggiore percentuale di FN al primo invio (6,9%). Negli altri invii si osservano valori falsi negativi dal 3,4% all'1,6% (nel sesto invio non erano presenti campioni tra le 100 e 75 UI/mL).



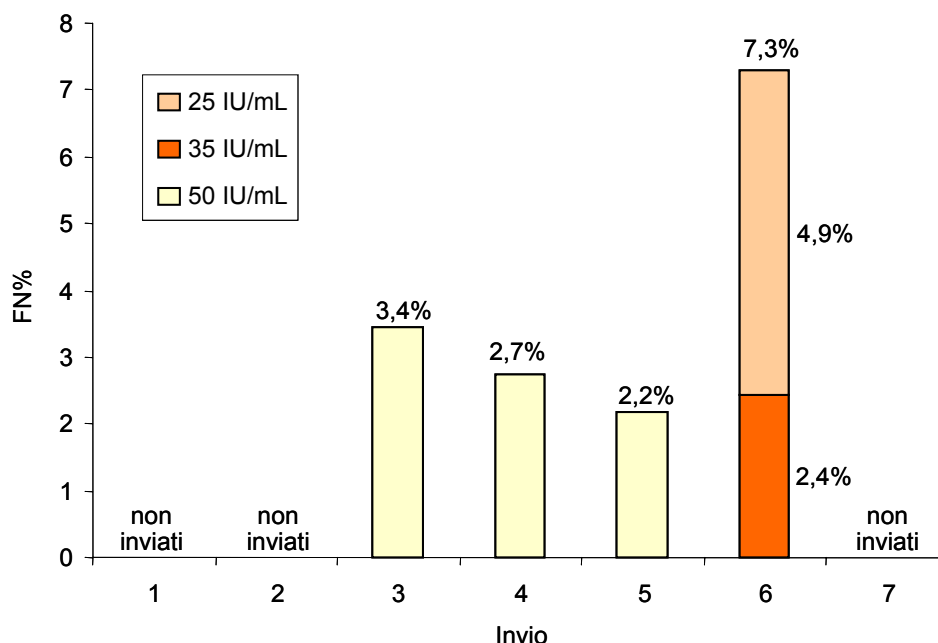
**Figura 4. Valutazione dei risultati in relazione al titolo virale nei differenti invii: campioni 1000-170 IU/mL**



**Figura 5. Valutazione dei risultati in relazione al titolo virale nei differenti invii: campioni 100-75 IU/mL**

I campioni a basso titolo (tra 25 e 50 UI/mL) sono stati distribuiti ai laboratori in solo quattro invii, dal terzo al sesto. Nei tre invii con 50 IU/mL si osservano valori di FN che decrescono progressivamente dal terzo (3,4%), al quinto invio (2,2%) (Figura 6). Nel sesto invio erano presenti campioni con titolo inferiore (25 e 35 IU/mL) e la percentuale di FN aumentava al

7,3%, di cui 4,9% a carico dei campioni da 25 UI/mL, e il 2,4% a carico dei campioni da 35 UI/mL.



**Figura 6. Valutazione dei risultati in relazione al titolo virale nei differenti invii: campioni 50-25 IU/mL**

### Valutazione globale dei risultati in relazione al titolo virale

Sono stati valutati globalmente i risultati FN raggruppati in base al titolo virale dei campioni inviati (Figura 7).

I campioni da 1000 UI/mL sono stati distribuiti esclusivamente al primo invio e hanno presentato una correttezza di classificazione del 99,4%. Un laboratorio ha classificato uno dei due campioni inviati come negativo (percentuale di FN 0,6%).

I campioni da 500 UI/mL sono stati distribuiti in cinque invii ed hanno presentato una correttezza di classificazione del 99,8%. Il campione da 170 UI/mL presente nel sesto invio ha avuto una correttezza di classificazione del 100%.

Per i campioni da 100 UI/mL, presenti in sei invii, la percentuale di FN è risultata del 3,3% con una correttezza di classificazione del 96,7%.

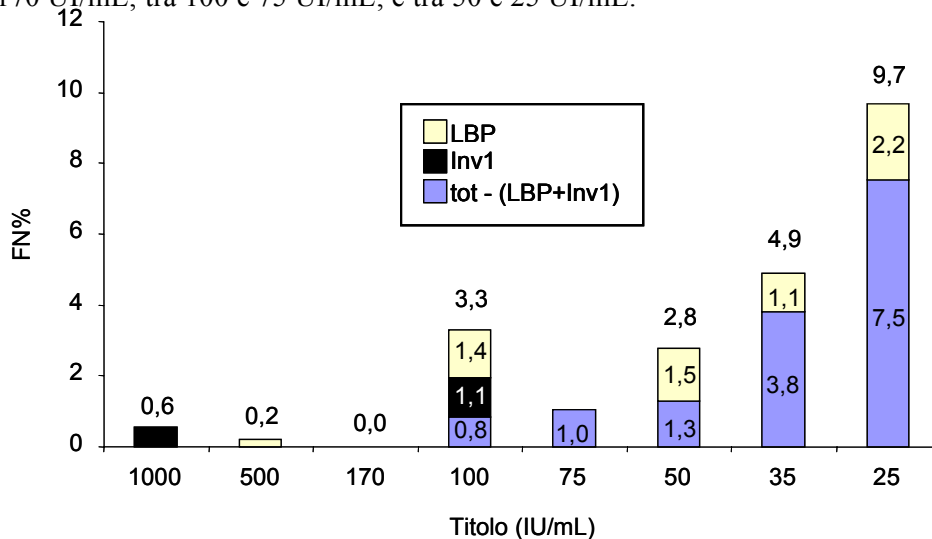
Per i campioni a basso titolo (75-50-35-25 UI/mL) i dati hanno mostrato un andamento di FN inversamente proporzionale al titolo virale. Si è osservata una percentuale di FN dell'1,0% per i campioni a 75 UI/mL e del 9,7% per i campioni a 25 UI/mL.

Una quota significativa di errori era a carico di cinque ST (errori sui campioni con un titolo maggiore o uguale alle 100UI/mL in almeno tre invii), indicate come laboratori a bassa performance (LBP) a cui sono da attribuirsi il maggior numero di FN come è stato riportato in Figura 7. Un alto numero di errori è risultato anche nel primo invio.

### Valutazione dei risultati falsi negativi in relazione al genotipo virale

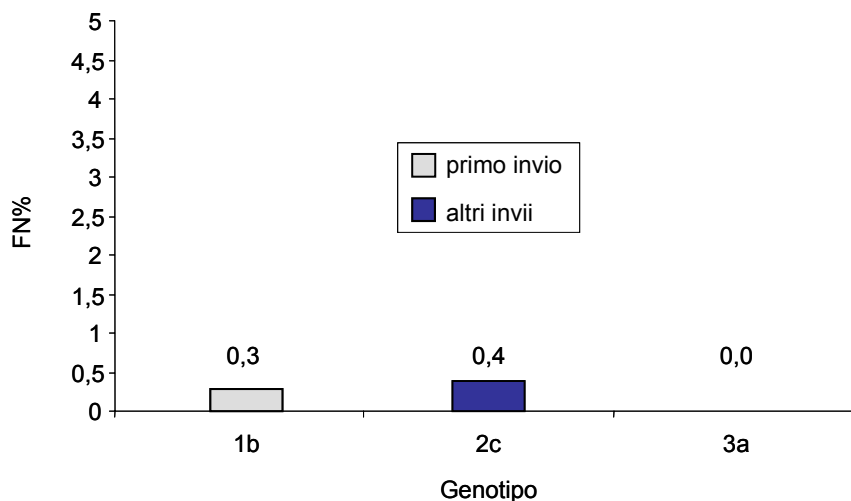
I campioni positivi selezionati per il Programma di VEQ appartenevano a tre differenti genotipi virali dell'HCV. Durante il Programma sono stati effettuati tre invii di genotipo 1b,

due di genotipo 2c e due di genotipo 3a. I risultati, in base al genotipo dei campioni inviati, sono stati valutati in rapporto al titolo virale e suddivisi in: campioni con titolo compreso tra 1000 e 170 UI/mL; tra 100 e 75 UI/mL; e tra 50 e 25 UI/mL.



**Figura 7. Valutazione dei risultati in relazione al titolo virale**

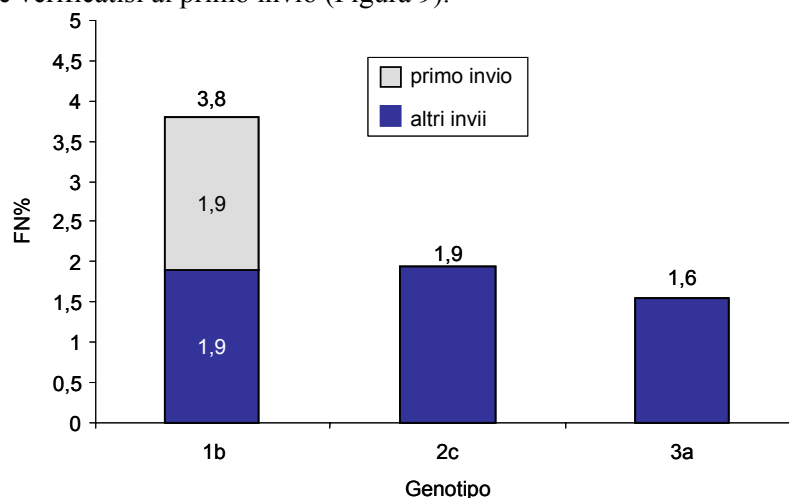
Per i campioni con titolo compreso fra 1000 UI/mL e 170 UI/mL la percentuale di FN è risultata essere dello 0,3% per il genotipo 1b, dello 0,4% per il genotipo 2c e dello 0,0% per il genotipo 3a. La quota di FN per il genotipo 1b è interamente dipendente dal primo invio (Figura 8).



**Figura 8. Valutazione dei risultati in relazione al genotipo virale: campioni tra 1000-170 IU/mL**

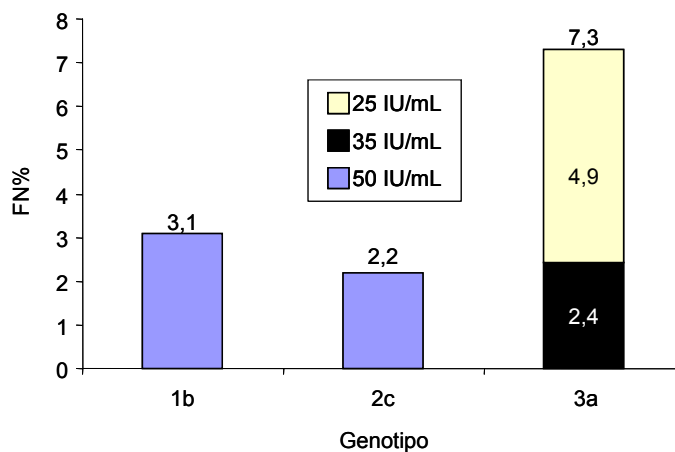
Per i campioni con titolo compreso fra 100 UI/mL e 75 UI/mL la percentuale di FN è risultata essere del 3,8% per il genotipo 1b, del 1,9% per il genotipo 2c e del 1,6% per il

genotipo 3a. Per il genotipo 1b si osserva che la metà dei FN (1,9%), è dovuta ad errori di classificazione verificatisi al primo invio (Figura 9).



**Figura 9. Valutazione dei risultati in relazione al genotipo virale: campioni tra 100-75 IU/mL**

Per i campioni con titolo minore o uguale a 50 UI/mL la percentuale di FN è risultata essere del 3,1% per il genotipo 1b, del 2,2% per il genotipo 2c e del 7,3% per il genotipo 3a. Esclusivamente per il genotipo 3a erano stati inclusi campioni con titolo di 25 e 35 UI/mL. I campioni con titolo più basso (25 UI/mL) hanno presentato la percentuale più alta di FN (4,9%), vedi Figura 10.



**Figura 10. Valutazione dei risultati in relazione al genotipo virale: campioni ≤50 IU/mL**

## Riproducibilità

Per valutare la riproducibilità dei risultati è stata prevista la presenza di uno stesso campione presentato con codice diverso, nell'ambito dello stesso invio (riproducibilità all'interno della serie). La riproducibilità è stata valutata come la ripetibilità tra i risultati ottenuti su tale campione

indipendentemente dal risultato analitico.

Il programma di elaborazione dati distribuisce i codici dei laboratori in base alle risposte da essi forniti evidenziando il codice in presenza di errori. Il singolo laboratorio ha la possibilità di verificare la propria riproducibilità attraverso il numero di codice che sarà ripetuto ed evidenziato, in caso di risultati non riproducibili.

Le tabelle 2 e 3 evidenziano la tipologia dei campioni in duplicato nei vari invii nel corso degli anni e il numero dei laboratori che hanno riportato o meno lo stesso risultato per i campioni in duplicato (espressa come percentuale di concordanza/discordanza). Il numero dei laboratori "concordanti" è stato riportato nella tabella in base alla classificazione data al campione inviato in duplicato. La riproducibilità non implica che il campione sia stato classificato correttamente.

I valori di riproducibilità per i campioni positivi all'HCV presentano un valore medio di 95,3%, con il valore di riproducibilità più elevato (98,9%) riferito al campione ad alto titolo (1000 UI/mL) del primo invio del 2002.

**Tabella 2. Riproducibilità intra-saggio dei campioni positivi (numero e % di laboratori)**

CAMPIONE (UI/mL)	NEG		POS		IND		NC		TOTALE			
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%	Concord.		Discord.	
100 (2002 I invio)	3	3,4	78	87,6	-	-	1	1,1	82	92,1	7	7,9
1000 (2002 I invio)	-	-	87	97,8	-	-	1	1,1	88	98,9	1	1,1
100 (2002 II invio)	1	1,1	85	96,6	-	-	-	-	86	97,7	2	2,3
500 (2002 II invio)	-	-	86	97,7	-	-	-	-	86	97,7	2	2,3
50 (2003 I invio)	2	2,2	83	93,3	-	-	2	2,2	87	97,7	2	2,2
100 (2003 I invio)	1	1,1	82	92,1	-	-	2	2,2	85	95,5	4	4,5
50 (2003 II invio)	-	-	86	92,5	-	-	2	2,1	88	94,6	5	5,4
100(2003 II invio)	1	1,0	85	91,4	-	-	2	2,1	88	94,6	5	5,4
50 (2003 III invio)	1	1,0	88	93,6	-	-	1	1,0	90	95,7	4	4,3
100 (2003 III invio)	1	1,0	90	95,7	-	-	1	1,0	92	97,8	2	2,2
25 (2004)	4	4,2	79	83,1	-	-	1	1,0	84	88,4	11	11,6
35 (2004)	1	1,0	83	87,4	1	1,0	1	1,0	86	90,5	9	9,5
75 (2005)	-	-	94	95,0	-	-	2	2,0	96	97,0	3	3,0
100 (2005)	1	1,0	93	94,0	-	-	2	2,0	96	97,0	3	3,0

nc = non classificato; ind = indeterminato

I campioni negativi presentano un valore medio di riproducibilità del 96,7% (Tabella 3). Nel 2002 sono stati spediti quattro campioni negativi provenienti da un'unica preparazione, mentre nei restanti invii ne sono stati spediti tre.

**Tabella 3. Riproducibilità intra-saggio dei campioni negativi (numero e % di laboratori)**

CAMPIONE (UI/mL)	NEG		POS		IND		NC		TOTALE			
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%	Concord.		Discord.	
4 negativi (2002 I invio)	84	94,4	-	-	-	-	1	1,1	85	95,5	4	4,5
4 negativi (2002 II invio)	82	93,2	-	-	-	-	-	-	82	93,2	6	6,8
3 negativi (2003 I invio)	85	95,5	-	-	-	-	2	2,2	87	97,7	2	2,2
3 negativi (2003 II invio)	91	97,8	-	-	-	-	2	2,1	93	100	-	-
3 negativi (2003 III invio)	90	95,7	-	-	-	-	1	1,0	91	96,8	3	3,2
3 negativi (2004)	92	96,8	-	-	-	-	1	1,0	93	97,9	2	2,1
3 negativi (2005)	93	94,0	-	-	-	-	2	2,0	95	96,0	4	4,0

nc = non classificato; ind = indeterminato

## DISCUSSIONE

L'esecuzione di controlli di qualità interni e la partecipazione ai programmi di VEQ rappresentano un requisito essenziale per l'accreditamento e la certificazione dei laboratori (25-27). In particolare per le ST la attivazione di programmi di VEQ è un requisito richiesto dalla normativa vigente (DPCM 1 settembre 2000) al fine di garantire la sicurezza dell'unità di sangue. I programmi di VEQ sono uno strumento, gestito da un laboratorio di riferimento, che permette alle singole strutture partecipanti di misurare l'accuratezza dei propri risultati, mediante un'autovalutazione basata anche sul confronto con altri laboratori. Un programma di VEQ è stato organizzato dall'ISS, a partire dal 2002, per i ST italiani per la tecnica di amplificazione del genoma virale dell'HCV in seguito all'obbligatorietà di eseguire questo test sulle singole unità di sangue ed emocomponenti donate (Circolare 14/2001). La circolare ha reso obbligatorio l'impiego di questo saggio a partire dal 28 giugno 2002.

Il rischio di trasmissione di malattie infettive con la trasfusione, in particolare per quelle i cui marcatori vengono testati sulle singole donazioni per obbligo di legge, è oggi estremamente ridotto. La maggiore sicurezza è dovuto in larga parte alla sempre più accurata selezione del donatore, e all'utilizzo di tecniche di screening sempre più avanzate ed efficienti (28-31). A questo scopo è stata introdotta la tecnica di amplificazione del genoma virale nello screening dei donatori per la rilevazione dell'infezione da HCV. La metodica NAT permette di individuare ed escludere unità di sangue che presentano un'infezione HCV in atto e con iniziale e/o non rilevabile sviluppo di anticorpi. Questo periodo di infettività responsabile del rischio di trasmissione delle infezioni, chiamato "fase finestra", attraverso le indagini molecolari viene ridotto a 12 giorni, rispetto al periodo stimato di 70 giorni con la determinazione degli anticorpi per l'HCV (12, 32).

In seguito alla Circolare n. 17 (31 ottobre 2000) volta a consentire l'introduzione della ricerca di costituenti virali dell'HCV mediante tecnica di amplificazione di acidi nucleici sul sangue e gli emocomponenti destinati ad uso trasfusionale era stato attivato uno studio di fattibilità, coordinato dall'ISS, che aveva evidenziato la necessità di concentrare l'uso di tale tecnica in un numero limitato di strutture. Questo ha richiesto una revisione degli schemi organizzativi del sistema trasfusionale a livello regionale come riportato nella Circolare n. 14 (dicembre 2001). In tal senso in alcune Regioni si è predisposta la massima centralizzazione, con l'identificazione di un singola Struttura che effettua le analisi su tutte le donazioni della Regione e in altre comunque un accorpamento che riduceva a 110 le strutture identificate per la determinazione del genoma virale con la NAT a fronte delle 326 ST censite sul territorio (14).

La Linea Guida per la validazione delle metodiche NAT destinate alla rilevazione di HCV-RNA in pool di plasma (PA/PH/OMCL (98) 22) elaborata dall'*European Network of Medicines Control Laboratories* ha definito i criteri di validazione e ha stabilito le modalità di valutazione dell'adequazione delle procedure analitiche di amplificazione genica per la rilevazione qualitativa della presenza del virus HCV.

Il programma di VEQ organizzato dall'ISS presso i ST italiani è stato avviato nel 2002 sia per valutare la performance del laboratorio nell'applicare il test in condizioni di routine sia per consentire il confronto tra i risultati ottenuti in laboratori diversi.

L'adesione al programma è risultata, fin dal primo invio, molto elevata ed è ulteriormente aumentata nel corso dei successivi esercizi; la stessa osservazione è valida per quanto attiene all'effettiva partecipazione, valutata in termini di ST che hanno puntualmente risposto agli invii. Entrambi i dati testimoniano il notevole interesse suscitato dal programma nei trasfusionisti italiani, che hanno immediatamente compreso e colto l'opportunità di potersi misurare e confrontare nell'utilizzo di una tecnologia altamente innovativa.

Un ruolo importante ha avuto anche la contemporanea partecipazione al “Programma nazionale di valutazione esterna della qualità per i test di screening anti-HIV, anti-HCV e HBsAg presso i Servizi Trasfusionali italiani”, organizzato dall’ISS, da cui sono stati mutuati il modello organizzativo e le caratteristiche fondamentali. Le ST hanno avuto, in tal modo, la possibilità di acquisire una immediata familiarità con lo schema del Programma.

L’alta copertura di ST che ha aderito al programma ha permesso di avere un quadro completo delle performance dello screening delle unità di sangue per HCV-RNA in Italia. I risultati ottenuti mostrano una buona performance della maggior parte delle ST italiane nell’esecuzione del saggio; sono comunque state individuate cinque strutture che sono state definite a bassa performance in quanto riportavano risultati “falsi negativi” su campioni con titolo maggiore o uguale alle 100 UI/mL in almeno tre differenti invii.

La Direttiva Europea 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro e recepita in Italia dal DL 332/2000, ribadisce che il controllo della qualità e l’autorizzazione al commercio dei kit diagnostici sono di esclusiva competenza degli Organismi Notificati e sono attuati attraverso sistemi di “Batch Release”. Nella stessa Direttiva viene ribadito il ruolo essenziale dei Programmi VEQ nelle procedure di vigilanza, ovvero nella capacità di evidenziare la presenza e/o la persistenza di eventuali non conformità dei prodotti in commercio.

Per lo studio sono stati applicati kit diagnostici autorizzati in base alle procedure autorizzative nazionali (DM 03/03/1987, n. 133, DM 12/12/1991, DPR 6/10/1998 n. 392, Circolare 30/10/2000 n. 17) successivamente certificati con l’applicazione di marcatura CE (DL.vo 8/09/2000 n. 332). In particolare sono stati utilizzati i kit della Roche Diagnostic, e della Chiron Corporation. Il kit “COBAS Ampliscreen™ HCV Test”, è destinato all’identificazione del solo HCV-RNA e prevede, di routine, l’esecuzione del test su minipool di plasma. I kit della Chiron, permettono su campioni singoli di identificare contemporaneamente la presenza dell’RNA sia di HCV che di HIV-1, marcatore di infettività la cui ricerca è obbligatoria solo in alcune Regioni.

Sono state calcolate l’accuratezza di classificazione dei campioni e le percentuali di falsi negativi e di falsi positivi per tutte le tipologie dei campioni inviati nel corso degli anni di svolgimento del programma.

Come evidenziato nei risultati, per poter avere un maggior numero di informazioni, sui campioni positivi sono state eseguite tre diverse tipologie di analisi dei dati che hanno permesso una valutazione dei risultati in relazione al titolo virale indipendentemente dagli invii, al titolo virale nei diversi invii e al genotipo virale.

I dati hanno mostrato un andamento di falsi negativi inversamente proporzionale al titolo virale; per i campioni a basso titolo (50 UI/mL) la percentuale di falsi negativi è diminuita progressivamente nel corso degli invii.

Non sono state osservate differenze rilevanti nella sensibilità dei saggi per i tre genotipi compresi tra i quattro più frequenti sul territorio italiano, utilizzati nella preparazione dei pannelli. Sarebbe importante valutare il comportamento degli altri genotipi; in particolar modo del genotipo 4 che è diffusamente presente nel sud dell’Italia.

Nei risultati sono state evidenziate anche le percentuali di errore di classificazione a carico del primo invio e delle risposte dei cinque laboratori a bassa performance. Vi sono stati molti laboratori che hanno fornito risposte non conformi soltanto al primo invio. Questo può essere derivato sia dall’aver fornito più dettagliate raccomandazioni e informazioni relative al programma stesso che alle misure correttive messe in atto dalle Strutture. Queste strutture sulla base dei risultati dei loro saggi, dovrebbero attivare meccanismi di controllo, con un riesame delle procedure interne e della qualificazione del personale per l’implementazione di adeguate misure correttive. Successivi esercizi di VEQ dovrebbero consentire a tutte le Strutture, comprese quelle rilevate a bassa performance di attivare misure correttive per effettuare i test



con la massima precisione e accuratezza per assicurare la massima sicurezza dell'unità trasfusionale. A questo proposito i programmi di controllo di qualità esterno hanno giocato sin dall'inizio un ruolo "chiave" nella implementazione di tali metodologie nei laboratori trasfusionali e diagnostici, e a tutt'oggi rappresentano per tali strutture un punto di controllo e di sicurezza importante (33-44).

## BIBLIOGRAFIA

1. Bullock DG. External quality assessment schemes for clinical chemistry in the United Kingdom. *Ann Ist Super Sanità* 1995;31(1):61-9.
2. Buratta A. External quality assessment programs in Lombardy, Italy. *Ann Ist Super Sanità* 1995;31(1):157-61.
3. Reinauer H. External quality assessment schemes for clinical chemistry in Germany. *Ann Ist Super Sanità* 1995;31(1):77-86.
4. Vives-Corrons JL, Gutierrez G, Jou JM, Reverter JC, Martinez-Brotons F, Domingo A, Iriarte JA. Characteristics and performance of the external quality assessment scheme (EQAS) for haematology in Spain. Ten years of experience. *Ann Ist Super Sanità* 1995;31(1):95-101.
5. Barca A, Sardelli S, Mozzi F, Pizzocolo G, Orlando M. Programma nazionale di valutazione esterna della qualità dei test di screening per la ricerca di HBsAg, anti-HCV e anti-HIV presso le strutture trasfusionali: attività e risultati 1992/1996. *Ligand Assay* 1997;2(4):224-9.
6. Gonzalez M, Règine V, Piccinini V, Vulcano F, Giampaolo A, Hassan HJ. Residual risk of transfusion-transmitted Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C Virus, and Hepatitis B Virus infections in Italy. *Transfusion* 2005;45:1670-5.
7. EMEA. CPMP/BWP/390/97 – *The introduction of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of Hepatitis C virus RNA in plasma pools*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/039097en.pdf>; ultima consultazione 3/5/2007.
8. Italia. Decreto Ministero della Sanità 29/3/1999 – Introduzione della ricerca di acido nucleico del virus dell'epatite C mediante la tecnica di amplificazione genica dei pool di plasma umano utilizzati per la produzione di emoderivati.
9. Italia. Circolare Ministro della Sanità 30/10/2000 N. 17 – Adeguamento dei livelli di sicurezza trasfusionale in presenza di metodiche atte alle indagini sui costituenti virali per HCV.
10. Italia. Circolare Ministro della Sanità 19/12/2001 N. 14 – Indicazioni integrative alla circolare 30/10/2000 N. 17.
11. Tosti ME, Solinas S, Prati S, Salvaneschi L, Manca M, Francesconi M, Ciuffreda M, Girelli G, Mele A. An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy *Br J Haematol* 2002(1);117:215-9.
12. Velati C, Romanò L, Baruffi L, Pappalettera M, Carreri V, Zanetti A. Residual risk of transfusion-transmitted HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy. *Transfusion* 2002;42:989-93.
13. Miceli M, Chiazza P, Mannella E, Massaro AL, Orlando M, Rapicetta M, Gentili G, Verani P. Risultati dello studio di fattibilità per l'amplificazione delle tecniche NAT allo screening del sangue. In: Rapicetta M. (Ed.). *Atti del V Seminario di aggiornamento sull'epatite da virus HCV e nuovi virus potenzialmente epatici: diagnosi, epidemiologia, prevenzione e terapia*. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 20-21 dicembre 2000. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/32). p. 48-59.
14. Piccinini V, Abbonizio F, Catalano L, Hassan HJ. *Mappa delle Strutture Trasfusionali esistenti sul territorio nazionale (aggiornamento 2005)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Strumenti di riferimento 06/S1).
15. Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Yu MY; Collaborative Study Group. A World Health Organization International Standard for hepatitis A virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sang* 2005;89(1):52-8.

16. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A; WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001;80(1):63-71.
17. Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nubling M, Yu M. Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. The Collaborative Study Group. *Vox Sang* 2000;78(4):217-24.
18. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999;76(3):149-58.
19. Saldanha J, Lelie N, Yu MW, Heath A. B19 Collaborative Study Group. Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2002;82(1):24-31.
20. WHO International Working group on the Standardisation of Genomic Amplification Techniques for the Virological Safety Testing of Blood and Blood Products. *Introduction of Gene Amplification Techniques (GAT) for detection of Hepatitis C Virus in Plasma Pools. Addendum to notes for guidelines on plasma derived products 1997: CPMP/BWP/390/97*. London: WHO; 1997
21. Gentili G, Cristiano K, Pisani G, Bisso GM, Miceli M, Wirz M. National Collaborative Study Group Collaborative study for the calibration of a new Italian HCV RNA reference preparation against the international standard. *Ann Ist Super Sanità* 2003;39(2):183-7.
22. Candotti D, Richetin A, Cant B, Temple J, Sims C, Reeves I, Barbara JA, Allain JP. Evaluation of a transcription-mediated amplification-based HCV and HIV-1 RNA duplex assay for screening individual blood donations: a comparison with a minipool testing system. *Transfusion* 2003;43(2):215-25.
23. Araujo F, Henriques I, Monteiro F, Meireles E, Cruz A, Tavares G, Mota-Miranda A. Evaluation of NucliSens-AmpliScreen methodology to detect subtypes G of HIV-1 and 4c/4d of HCV in the screening of blood donors. *Transfus Clin Biol* 2005;12(4):331-5.
24. Koppelman MH, Assal A, Chudy M, Torres P, de Villaescusa RG, Reesink HW, Lelie PN, Cuypers HT. Multicenter performance evaluation of a transcription-mediated amplification assay for screening of human immunodeficiency virus-1 RNA, hepatitis C virus RNA, and hepatitis B virus DNA in blood donations. *Transfusion* 2005;45(12):1988.
25. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, Plebani M. External quality assessment schemes: need for recognised requirements. *Clin Chim Acta* 2001;309(2):183-99.
26. Libeer JC. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clin Chim Acta* 2001;309(2):173-7.
27. Goldie DJ. Accreditation of external quality assessment schemes in the United Kingdom. *Clin Chim Acta* 2001;309(2):179-81.
28. Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(5):713-21.
29. Vernet G. Molecular diagnostics in virology. *J Clin Virol* 2004;31(4):239-47.
30. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(3):190-212.
31. Niesters HG. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(1):5-11.
32. Regine V, Piccinini V, Gonzalez M, Catalano L, Hassan HJ. Sistema di sorveglianza sulle donazioni di sangue nelle strutture trasfusionali nell'anno 2002. *Not Ist Super* 2005;18(1):3-9.

33. Pisani G, Cristiano K, Saldanha J, Wirz M, Bisso GM, Mele C, Gentili G; EQA participants. External quality assessment for the detection of blood-borne viruses in plasma by nucleic acid amplification technology: the first human immunodeficiency virus and hepatitis B virus studies (HIV EQA/1 and HBV EQA/1) and the fifth hepatitis C virus study (HCV EQA/5). *Vox Sang* 2004;87(3):223.
34. Mancini C, Pisani G, Azzi A, Luisa Zerbini M, Gentili G, Mario Bisso G; MS participants. Inter-laboratory comparison of qualitative and quantitative detection of hepatitis C (HCV) virus RNA in diagnostic virology: a multicentre study (MS) in Italy. *J Clin Virol* 2004;30(4):313-9.
35. Mancini C, Zerbini M, Azzi A, Piunno M. Multicentre Italian Study Group (MISG) for the standardisation of hepatitis C virus (HCV) PCR. *J Clin Virol* 2003;27(1):83-9.
36. Damen M, Cuypers HT, Zaaijer HL, Reesink HW, Schaasberg WP, Gerlich WH, Niesters HG, Lelie PN. International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J Virol Methods* 1996;58(1-2):175-85.
37. Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing--where do we stand? *J Clin Virol* 2002;25(3):S13-21.
38. Schirm J, van Loon AM, Valentine-Thon E, Klapper PE, Reid J, Cleator GM. External quality assessment program for qualitative and quantitative detection of hepatitis C virus RNA in diagnostic virology. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2973-80.
39. Valentine-Thon E, van Loon AM, Schirm J, Reid J, Klapper PE, Cleator GM. European proficiency testing program for molecular detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4407-12.
40. Laperche S. Blood safety and nucleic acid testing in Europe. *Euro Surveill* 2005;10(2):3-4.
41. Soldan K, Davison L, Dow B. Estimates of the frequency of HBV, HCV, and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996 to 2003. *Euro Surveill* 2005;10(2):17-9.
42. Velati C, Fomiatti L, Baruffi L, Romanò L, Zanetti A, Gruppo Italiano per lo Studio delle Malattie Trasmissibili con la Trasfusione. Impact of nucleic acid amplification technology (NAT) in Italy in the three years following implementation (2001-2003). *Euro Surveill* 2005;10(2):12-4.
43. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000;40(2):143-59.
44. Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, van Drimmelen H, Quinti I, Furlini G, Galli S, Meliconi MG, Burns S, Hallam N, Sonnerborg A, Cilla G, Serrano E, Laccetti P, Portella G, Polywka S, Icardi G, Bruzzzone B, Balbo L, Alfarano A. European Paediatric Hepatitis C Virus Network. Inter-laboratory comparison of HCV-RNA assay results: implications for multi-centre research. *J Med Virol* 2003;69(2):195-201.

## **APPENDICE A**

**Modulistica allegata all'invio dei campioni**



## NOTE INFORMATIVE

Istituto Superiore di Sanità

### PROGRAMMA NAZIONALE DI VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITÀ DEL TEST NAT PER LA RICERCA DI HCV-RNA PRESSO I SERVIZI TRASFUSIONALI

#### NOTE INFORMATIVE

#### 1. FASE PRE-ANALITICA: RICEZIONE DEI CAMPIONI

Il pannello dei campioni, spedito tramite corriere, comprende:

- 8 campioni per la ricerca di HCV-RNA

I campioni sono costituiti da siero umano, e possono essere conservati in frigorifero a -20 °C se le analisi sono eseguite entro 24 h; altrimenti devono essere mantenuti a -70 °C fino al momento del loro impiego.

Tutti i campioni devono essere maneggiati con cautela trattandosi di campioni **infetti o potenzialmente infetti**.

#### 2. FASE ANALITICA: ESECUZIONE DEI TEST

I campioni **non devono essere inseriti nella procedura di pooling**, ma ciascun campione del pannello **deve essere considerato come un POOL già costituito**, e va analizzato, in singola determinazione, secondo le procedure di routine adottate per i pool delle donazioni.

- Chi utilizza il kit “Roche Cobas Ampliscreen™ HCV test” deve eseguire la “*Procedura di trattamento multipreparato*”.
- Chi utilizza il kit “Chiron TMA HIV-1/HCV Assay” o “Chiron Procleix HIV-1/HCV Assay”, deve eseguire la “*Procedura HIV-1/HCV Assay*” senza analizzare in seguito i campioni con i test discriminanti.

Tutti i campioni del pannello devono essere analizzati contemporaneamente ai campioni di normale routine e ai controlli positivi e negativi previsti dal kit adottato.

#### 3. FASE POST-ANALITICA: TRASCRIZIONE E INVIO DEI RISULTATI

La registrazione dei risultati ottenuti va effettuata sulla scheda acclusa ai campioni.

Per la compilazione si raccomanda di attenersi a quanto segue:

1. Riportare **SEMPRE** il Numero di Codice identificativo della Struttura Trasfusionale nella casella apposita, in alto a sinistra **sulla scheda**.  
**L'omissione del codice ST o la sua erronea trascrizione non consente l'attribuzione inequivocabile dei moduli pervenuti, impedendo l'inserimento e l'elaborazione dei dati e invalidando l'intero saggio.**
2. Il riquadro in alto a destra è riservato all'ISS.
3. Trascrivere accuratamente la data di esecuzione del saggio, barrare la casella relativa al kit utilizzato, e specificarne numero di lotto e data di scadenza.

4. **Compilare integralmente** la parte della scheda relativa ai controlli negativi e positivi, od ai calibratori e il *cut-off*, in base al kit utilizzato, avendo cura di trascrivere completamente le cifre nella loro parte intera e laddove presente decimale.  
**Tali dati consentono di verificare la correttezza dei limiti di accettabilità della seduta analitica: in assenza anche di uno solo di essi non È possibile elaborare i risultati.**
5. Indicare per ciascun campione:
  - a) il codice riportato sull'etichetta;  
**Si raccomanda a coloro che partecipano ad altri programmi di valutazione esterna di qualità di non confondere tra loro i codici dei campioni.**
  - b) I valori numerici di lettura ottenuti, trascrivendo correttamente le cifre intere e decimali nei quadratini.  
**Evitare diciture non numeriche quali: “over”, “out range”, ecc. poiché non valutabili dall'elaboratore.**  
**Nel caso di valori fuori limite riportare il valore massimo dello strumento di lettura adottato, preceduto dal simbolo “>” (maggiore); oppure usare la notazione equivalente composta da quattro asterischi.**
  - c) la classificazione deve essere attribuita in modo inequivocabile.  
Barrare la casella apposita nel riquadro “Classificazione del campione”.
6. Segnalare con tempestività ogni eventuale problema (variazioni nel nome del Responsabile e/o nell'indirizzo, mancata ricezione dei campioni, deterioramento o scarsità degli stessi, impossibilità ad eseguire l'analisi, etc.) esclusivamente a:  
**Dr.ssa Alessandra Barca, Tel. 06/49902404.**
7. Prima di spedire le risposte ricontrollare attentamente la scheda in ogni singola voce, confrontandola con quanto riportato sulle Note Informative (fase Post-Analitica).  
**Tale operazione in apparenza banale è, al contrario, di fondamentale importanza se si considera che la probabilità di commettere errori di trascrizione frequentemente riscontrati ad ogni invio, è molto elevata.**

I risultati vanno inviati entro il termine indicato sulla scheda, potendo scegliere tra:

- **Posta:** spedire al seguente indirizzo:

Dr.ssa Alessandra Barca  
Laboratorio di Biochimica Clinica  
**Istituto Superiore di Sanità**  
Viale Regina Elena, 299  
**00161 ROMA**

Si prega di evitare l'applicazione di punti metallici e di  
**conservare sempre copia delle risposte inviate.**


- **FAX:** inviare esclusivamente al numero

**06/49387202**  
**All'attenzione della Dr.ssa Alessandra Barca.**

**L'invio a recapiti diversi da questo può comportare lo smarrimento delle risposte.**



# Scheda per la rilevazione di HCV-RNA

 <b>PROGRAMMA NAZIONALE DI VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITA' DEL TEST NAT PER LA RICERCA DI HCV-RNA, PRESSO I SERVIZI TRASFUSIONALI.</b>		<b>Prot. N.</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 10px; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>HCV-RNA</b> </div>		<b>SAGGIO</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	
(non compilare, a cura dell'I.S.S.)			
<b>CODICE S.T.</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>			
<b>Data di arrivo dei campioni:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>		<b>Data di esecuzione del test:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px; display: inline-block;"> <b>KIT</b> </div>			
Barrare la casella del kit usato e compilare i dati relativi			
<b>ROCHE - COBAS AmpliScreen™ HCV Test</b> <input type="checkbox"/>		<b>CHIRON - PROCLEIX HIV-1/HCV</b> <input type="checkbox"/>	
<b>N. Lotto</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span> <b>Scadenza</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>		<b>CHIRON - PROCLEIX Ultrio</b> <input type="checkbox"/>	
<b>N. Lotto</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span> <b>Scadenza</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>		<b>N. Lotto</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span> <b>Scadenza</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	
Analita O.D.	Controllo interno O.D.	Analita RLU	Controllo interno RLU
Controllo Neg.	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	Media Calibratori Neg.	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>
Controllo Pos.	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	Media Calibratori Pos.1	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>
		Media Calibratori Pos.2	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>
		Media Calibratori Pos.3*	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>
		(Solo per il kit Ultrio)*	
		<b>N° Calibratori validi:</b> Neg. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span> Pos.1 <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span> Pos.2 <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span> Pos.3 <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	
		<b>Cut-off</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	
<b>Codice Campione</b>	<b>O.D. / RLU Campione</b>	<b>O.D. / RLU Controllo Interno</b>	<b>Classificazione del Campione</b>
			<b>Pos.</b> <input type="checkbox"/> <b>Neg.</b> <input type="checkbox"/> <b>Dubbio</b> <input type="checkbox"/> <b>Non Val.</b> <input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  </span>	<input type="checkbox"/>
<b>Restituire entro il</b> <b>per posta o fax al seguente recapito :</b> <b>Dr.ssa Alessandra BARCA</b> <b>ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'</b> <b>Laboratorio Biochimica Clinica</b> <b>Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA</b> <b>Tel.: 06.4990.2404 - Fax : 06.4938.7202</b>			<b>Osservazioni:</b> <div style="border: 1px solid black; height: 40px; width: 100%;"></div>
<b>Il Responsabile</b> _____			



## **APPENDICE B**

### **Rapporto conclusivo sulla elaborazione dati**



## ALLEGATO B1 - Lettera riassuntiva

**Al Responsabile per il Programma**

**Oggetto: Programma Nazionale di Valutazione Esterna della Qualità del test NAT per la ricerca di HCV-RNA, presso i ST.**

**Caro Collega,**

Le trasmettiamo i risultati relativi ai campioni del 1° invio 2005 del Programma in oggetto, spediti tra il 18 e il 20 Aprile 2005. Oltre ai risultati, Le inviamo le note esplicative per la corretta interpretazione dell'elaborato, nelle quali vengono riportati i criteri di classificazione impiegati ai fini dell'elaborazione.

Dall'esame delle schede è risultato, per quanto concerne l'identificazione dei campioni, un buon livello di corrispondenza e precisione dell'analisi, come si evince dai dati riassuntivi allegati e relativi a tutti i Centri Trasfusionali partecipanti.

Per quanto concerne la compilazione delle schede, è stata osservata la presenza di alcune inesattezze e in particolare casi di non completa compilazione per quanto concerne la data di arrivo dei campioni, la data di esecuzione del test, il numero e la scadenza del lotto del kit utilizzato, la classificazione del campione nell'apposita casella e la mancata trascrizione dei valori di *cut-off* dell'Analita e del Controllo Interno.

La ringraziamo per la collaborazione che vorrà continuare a darci.

Cordiali saluti.

Dott.ssa H. Jane Hassan  
**Direttore del Reparto  
Metodologie Trasfusionali**

Dott.ssa Maria Rapicetta  
**Responsabile Scientifico  
Direttore del Reparto Epatiti Virali**

## ALLEGATO B2 – Note Esplicative

SAGGIO 0501

### ORGANIZZAZIONE GENERALE

#### A) CAMPIONI

I campioni relativi a questo saggio sono stati inviati tra il 18 e il 20 Aprile 2005. I campioni forniti erano i seguenti:

- Pool 1 siero HCV-RNA (circa 75 UI/mL)
- Pool 2 siero HCV-RNA (circa 75 UI/mL)
- Pool 3 siero HCV-RNA (circa 100 UI/mL)
- Pool 4 siero HCV-RNA (circa 100 UI/mL)
- Pool 5 siero HCV-RNA (circa 500 UI/mL)
- Pool 6 siero negativo
- Pool 7 siero negativo
- Pool 8 siero negativo

#### B) CRITERI DI CLASSIFICAZIONE

I criteri di classificazione dei due kit utilizzati sono i seguenti:

##### **ROCHE-COBAS Ampliscreen HCV Test versione 2.0**

- ⇒ *positivo* se: D.O.  $\geq 0,75$  (analita) e D.O. qualsiasi (controllo interno, C.I.);
- ⇒ *negativo* se: D.O.  $< 0,20$  (analita) e D.O.  $\geq 0,20$  (C.I.);
- ⇒ *dubbio* se: D.O.  $\geq 0,20$  e  $< 0,75$  (analita) e D.O. qualsiasi (C.I.).

##### **CHIRON – PROCLEIX HIV-1/HCV**

##### **CHIRON – PROCLEIX Ultrio Assay**

- ⇒ *positivo* se: analita S/CO  $\geq 1$  e C.I.  $\leq 475.000$  R.L.U.;
- ⇒ *negativo* se: analita S/CO  $< 1$  e C.I.  $\geq$  C.I. *cut-off* e C.I.  $\leq 475.000$  R.L.U.

### RISULTATI

#### A) ANALISI DEI RISULTATI PER CENTRO

Per ogni singolo Centro viene riportato il riepilogo dei dati desunti dalla scheda inviata (valori dei controlli negativi e positivi e *cut-off* in base al kit utilizzato).

In aggiunta vengono forniti:

- ⇒ decodifica dei campioni inviati (Pool);
- ⇒ classificazione di ciascun campione ottenuta nei laboratori di riferimento (**cl. rif.**);
- ⇒ errori di trascrizione della sigla dei campioni e dei valori dei controlli, calibratori e *cut-off* (segnalati in grigio);
- ⇒ errori di interpretazione del valore ottenuto comportanti errori di classificazione del campione (segnalati in grigio). In questo caso a fianco della Vostra classificazione compare la **classificazione coerente**, indicante la classificazione che si sarebbe dovuta dare in base ai valori ottenuti. Tale classificazione ovviamente può coincidere con la classificazione di riferimento.

**B) VALUTAZIONE GLOBALE DEI RISULTATI PER CAMPIONE**  
**(SECONDO LA CLASSIFICAZIONE DA VOI ASSEGNATA E SECONDO**  
**LA CLASSIFICAZIONE COERENTE)**

Per ogni campione inviato è stata effettuata la distribuzione delle classificazioni ottenute complessivamente in tutti i Centri partecipanti basandosi sulla classificazione indicata dai singoli Centri (**classificazione da Voi assegnata**) e la **classificazione coerente**.

Utilizzando tale distribuzione il singolo Centro, identificato dal proprio numero di codice, potrà verificare la propria prestazione. Sotto la voce Non Valutabile sono inclusi quei Centri che non hanno fornito risultati elaborabili.

**C) RISULTATI OTTENUTI DAI LABORATORI DI RIFERIMENTO**

A titolo di esemplificazione, vengono riportati i risultati ottenuti nei Laboratori di riferimento con i kit CHIRON-PROCLEIX HIV-1/HCV e ROCHE-COBAS Ampliscreen HCV Test versione 2.0.

## ALLEGATO B3 - Scheda di valutazione globale dei risultati (per singolo campione)

Istituto Superiore di Sanità

PROGRAMMA NAZIONALE DI VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITÀ DEL  
TEST NAT PER LA RICERCA DI HCV-RNA PRESSO I SERVIZI TRASFUSIONALI

HCV-RNA

SAGGIO 0501

VALUTAZIONE GLOBALE DEI RISULTATI PER CAMPIONE

Campioni N. 3-4 (Campioni positivi)

Centri partecipanti: 100

Centri rispondenti: 99

Campioni valutati: 198

Distribuzione dei Centri per risultato

Classificazione	Assegnata						Coerente					
	N.	%	Centro				N.	%	Centro			
Positivo	193	97,47	0101	0102	0103	0104	185	93,43	0101	0102	0103	0104
			0106	0201	0301	0302			0106	0201	0301	0302
			0303	0304	0305	0401			0304	0305	0401	0501
			0501	0502	0503	0504			0502	0503	0504	0505
			0505	0506	0601	0602			0506	0601	0602	0603
			0603	0701	0702	0703			0701	0702	0703	0801
			0801	0802	0803	0804			0802	0803	0804	0805
			0805	0806	0807	0808			0806	0807	0808	0901
			0901	0902	0903	0904			0902	0903	0904	0905
			0905	0906	0907	0908			0906	0907	0908	0909
			0909	0910	0911	0912			0910	0911	0912	0913
			0913	1001	1101	1201			1001	1101	1201	1202
			1202	1203	1204	1205			1203	1204	1205	1206
			1206	1207	1209	1210			1207	1209	1210	1211
			1211	1212	1213	1214			1213	1214	1301	1302
			1301	1302	1303	1304			1303	1304	1305	1306
			1305	1306	1307	1308			1307	1308	1309	1310
			1309	1310	1401	1402			1401	1402	1501	1502
			1501	1502	1503	1504			1503	1504	1601	1602
			1601	1602	1603	1604			1604	1701	1801	1802
			1701	1801	1802	1901			1901	2001	2002	2004
			2001	2002	2004	2005			2005	2006	2007	2009
			2006	2007	2008	2009			2010	2011	2012	2013
			2010	2011	2012	2013			2014	2015		
			2014	2015								
Negativo	4	2,02	0806	1208	1309	4	2,02	0806	1208	1309		
Dubbio	-	-				-	-					
Non Valido	1	0,51	0808			9	4,55	0303	0808	1212	1603	
Non Valutabile	-	-				-	-	2008				



**ALLEGATO B4 - Risultati ottenuti nei laboratori di riferimento**

Istituto Superiore di Sanità

**PROGRAMMA NAZIONALE DI VALUTAZIONE ESTERNA DELLA QUALITÀ  
DEL TEST NAT PER LA RICERCA DI HCV-RNA  
PRESSO I SERVIZI TRASFUSIONALI****RISULTATI OTTENUTI NEI LABORATORI DI RIFERIMENTO CON I KIT  
CHIRON - PROCLEIX HIV-1/HCV  
E ROCHE-COBAS Ampliscreen™ HCV Test****SAGGIO 0501**

N. Pool	HCV-RNA*	Genotipo
1	+	3a
2	+	3a
3	++	3a
4	++	3a
5	+++	3a
6	Negativo	-
7	Negativo	-
8	Negativo	-

**\* Legenda:**

+	≡	75 UI/mL	(range 68-83)
++	≡	100 UI/mL	(range 98-121)
+++	≡	500 UI/mL	(range 476-528)

Il titolo dei campioni è stato ottenuto mediante l'utilizzo della metodica Real Time PCR.



## **APPENDICE C**

### **Elenco dei laboratori partecipanti**



**ABRUZZO**

Barbara Mazzocco  
Amalia Procida  
Raffaele Pacchiarotta  
Natalia Toselli  
Gianfranco Zucca Giucca  
Marina Molino

Ospedale "SS. Filippo e Nicola"  
Ospedale "SS. Annunziata"  
Ospedale Nuovo "San Salvatore"  
Ospedale "Santo Spirito"  
Ospedale Civile di Teramo  
Ospedale Civile di Vasto

Avezzano (AQ)  
Chieti Scalo  
L'Aquila  
Pescara  
Teramo  
Vasto (CH)

**BASILICATA**

Maria Pafundi

Azienda Ospedaliera "San Carlo"

Potenza

**CALABRIA**

Anna Marino  
Giulia Caracciolo  
Angela Liguori  
Placido Baccellieri  
Paola Grandini

Azienda Ospedaliera "Pugliese-Ciaccio"  
Ospedale dell'Annunziata  
Ospedale "S. Giovanni di Dio"  
Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino-Morelli"  
A.S.L. 8 - Vibo Valentia

Catanzaro  
Cosenza  
Crotone  
Reggio Calabria  
Vibo Valentia

**CAMPANIA**

Vincenzo Perri

Azienda Ospedaliera "San Sebastiano"

Caserta

**EMILIA ROMAGNA**

William Marani  
Chiara Vecchi  
Paola Avanzini  
Marzia Argnani  
Roberta Immovilli  
Silvia Luchetti

Ospedale Maggiore  
Policlinico di Modena  
Ospedale Civile di Parma  
Ospedale "Santa Maria delle Croci"  
Azienda Ospedaliera "S. Maria Nuova"  
Ospedale degli Infermi

Bologna  
Modena  
Parma  
Ravenna  
Reggio Emilia  
Rimini

**FRIULI VENEZIA GIULIA**

Marcello Stecchina  
Antonino Raineri  
Patrizia Dello Russo

Ospedale Civile di Gorizia  
Azienda Ospedaliera "Santa Maria degli Angeli"  
Az1. Ospedaliera "S. Maria della Misericordia"

Gorizia  
Pordenone  
Udine

**LAZIO**

Micheline Miceli  
Antonella Ursitti  
Stefano Solinas

Croce Rossa Italiana  
Ospedale "Sandro Pertini"  
Policlinico Umberto I

Roma  
Roma  
Roma

**LIGURIA**

Maria Carla De Luigi  
Cinzia Lo Giudice  
Maria Gabriella Fica  
Ornella Perrone  
Livio Giorgi  
Fioravante Borri  
Caterina Valle  
Angela Deferrari

Azienda Ospedaliera "San Martino"  
Ospedale "G. Gaslini"  
E.O. Ospedale "Galliera"  
Ospedale Civile di Imperia  
Azienda Ospedaliera "Sant'Andrea"  
M.M. - MariSan La Spezia  
Ospedale "Santa Corona"  
Ospedale "San Paolo"

Genova  
Genova  
Genova  
Imperia  
La Spezia  
La Spezia  
Pietra Ligure (SV)  
Savona (SV)

**LOMBARDIA**

Roberto Sermisoni  
Mirella Marini  
Marina Poggio  
Luisa Pecoroni  
Andreina Lobbiani  
Eugenio Sala  
Giuseppe Cambiè  
Isa Carriolo  
Gian Alessandro Moroni  
Federico Chiodo  
Mara Mazzucco  
Claudio Velati  
Claudia Rinaldini

Azienda Ospedaliera OO.RR. di Bergamo  
Spedali Civili di Brescia  
Ospedale "Bassini"  
Azienda Ospedaliera di Cremona  
Azienda Ospedaliera "G. Salvini"  
Azienda Ospedaliera "Sant'Anna"  
Azienda Ospedaliera di Lodi  
Ospedale "Carlo Poma"  
Azienda Ospedaliera "San Paolo"  
Azienda Ospedaliera "Niguarda Ca' Granda"  
Policlinico "San Matteo"  
Ospedale Civile di Sondrio  
Ospedale di Circolo

Bergamo  
Brescia  
Cinisello Balsamo (MI)  
Cremona  
Garbagnate M. (MI)  
Laurate Caccivio (CO)  
Lodi  
Mantova  
Milano  
Milano  
Pavia  
Sondrio  
Varese

**MARCHE**

Giovanna Salvoni

Azienda Ospedaliera "Umberto I"

Ancona

**MOLISE**

Giuseppe Cimino

Ospedale "Cardarelli"

Campobasso

## PIEMONTE

Laura Mazzucco  
Paola Squillaro  
Maria Cirinnà  
Cristina Perugini  
Maurizia Bongera  
Magda Fruttero  
Paola Servato  
Mario Ziano  
Maria Luisa Goggi  
Laura Coucourde  
Paola Chiazza  
Paola Manzini  
Maurizio Lanteri  
Fulvia Milano

Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio"  
Ospedale degli Infermi  
Ospedale "SS. Trinità"  
Ospedale "Santo Spirito"  
Ospedale Civile di Cuorgnè  
Ospedale Maggiore "SS. Trinità"  
Ospedale "Santo Spirito"  
Ospedale Maggiore della Carità  
Ospedale "San Giacomo"  
Ospedale "E. Agnelli"  
Azienda Ospedaliera. O.I.R.M. "S. Anna"  
Azienda Ospedaliera "S. Giovanni Battista"  
Polo Ospedaliero di Verbania  
Ospedale "S. Andrea"

Alessandria  
Biella  
Borgomanero (NO)  
Casale Monferrato (AL)  
Cuorgnè (TO)  
Fossano (CN)  
Nizza Monferrato (AT)  
Novara  
Novi Ligure (AL)  
Pinerolo (TO)  
Torino  
Torino  
Verbania  
Versagli (Vercelli)

## PUGLIA

Concetta Di Chio  
Michela Di Loreto  
Riccardo Martinelli  
Camilli Francesca  
Francesco Vittorio  
Stefano Antoncecchi  
Michele Cantra  
Rosa Bruno  
Giuseppina Cellamare  
Emanuele Chiuri

Ospedale "L. Bonomo"  
Ospedale "San Paolo"  
Azienda Ospedaliera Policlinico di Bari  
Ospedale "Perrino - Di Summa"  
Azienda Ospedaliera Universitaria di Foggia  
Ospedale "San Giacomo"  
Casa Sollievo della Sofferenza  
Ospedale "SS. Annunziata"  
Ospedale Marina Militare  
Azienda Ospedaliera "Cardinale G. Panico"

Andria (BA)  
Bari  
Bari  
Brindisi  
Foggia  
Monopoli (BA)  
S. Giovanni Rotondo (FG)  
Taranto  
Taranto  
Tricase (LE)

## SARDEGNA

Michele Bajorek  
Mario Manca

Azienda Ospedaliera "Brotzu"  
Ospedale "SS. Annunziata"

Cagliari  
Sassari

## SICILIA

Antonino Laneri  
Francesco Spedale  
Pasquale di Paola  
Salvatore Calabrese

Ospedale "Vittorio Emanuele"  
Ospedale Basilotta  
Azienda Ospedaliera "Villa Sofia"  
Ospedale Civile di Ragusa

Catania  
Nicosia (EN)  
Palermo  
Ragusa

## TOSCANA

Cecilia Peduzzi  
Rosa Rulli  
Piero Palla  
Cristina Mariottini

Azienda Ospedaliera "Careggi"  
Stabilimento Chimico-Farmaceutico Militare  
Ospedale "Santa Chiara"  
Azienda Ospedaliera Senese

Firenze  
Firenze  
Pisa  
Siena

## TRENTINO ALTO ADIGE

Sandro Rinaldi

Ospedale Regionale

Bolzano

## UMBRIA

Alessandro Vujovic  
Augusto Scaccetti

Azienda Ospedaliera di Perugia  
Azienda Ospedaliera "Santa Maria"

Perugia  
Terni

## VALLE D'AOSTA

Alliod Silvia

Ospedale Regionale - UB Microbiologia

Aosta

## VENETO

Armanda Diamantini  
Alessio Borean  
Francesco Schiesari  
Giorgina M. Vaselli  
Renzo Risato  
Renzo Cristofoli  
Lorenzo Mazzariol  
Aldo Pavone  
Ornella Terenziani  
Riccardo Cusinato  
Bernardo Colaviti  
Rocco Potenza  
Fausto Bressan  
Lorenzo Picco  
Maria Costanza Bettin

Ospedale Civile di Bassano  
Ospedale "San Martino"  
Ospedale Civile di Bussolengo  
Ospedale Civile di Camposampiero  
Ospedale Civile di Castelfranco  
Ospedale Civile di Conegliano  
Ospedale Civile di Dolo  
Ospedale Civile di Este  
Ospedale "Mater Salutis"  
Azienda Ospedaliera di Padova  
Ospedale "San Tommaso"  
Ospedale "Santa Maria della Misericordia"  
Ospedale Civile di San Bonifacio  
Ospedale "San Camillo de' Lellis"  
Ospedale "San Bortolo"

Bassano del Grappa (VI)  
Belluno  
Bussolengo (VR)  
Camposampiero (PD)  
Castelfranco V. (TV)  
Conegliano V. (TV)  
Dolo (VE)  
Este (PD)  
Legnago (VR)  
Padova  
Portogruaro (VE)  
Rovigo  
San Bonifacio (VR)  
Schio (VI)  
Vicenza

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, marzo 2007 (n. 1) 7° Suppl.*