



Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati

Circuito interlaboratorio per la diagnosi della rabbia
Report definitivo schema AQUA RV-D 1-23
Anno erogazione 2023

Responsabile Circuito interlaboratorio AQUA per la diagnosi della rabbia (AQUA RV-D)
Dr.ssa Paola De Benedictis *Tel. 049/8084385*
e-mail pdebenedictis@izsvenezie.it

Responsabile tecnico
Dr.ssa Barbara Zecchin *Tel. 049/8084387*
e-mail bazecchin@izsvenezie.it

Responsabile statistico
Dr.ssa Mancin Marzia *Tel.049/8084431*
e-mail mmancin@izsvenezie.it

Segreteria
Dr.ssa Paola Mozzi *Tel. 049 8084371-369*
e-mail pmozzi@izsvenezie.it

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Centro di Referenza Nazionale per la rabbia
V.le dell'Università 10 – 35020 LEGNARO (PD)
www.izsvenezie.it

Introduzione	4
1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni.....	4
1.1 Composizione dei campioni prova.....	4
<i>Tabella 1: Composizione del pannello dello schema AQUA RV-D 1-23</i>	5
1.2 Prove di omogeneità e stabilità	5
2. Invio e istruzioni per la preparazione e utilizzo dei campioni prova.....	5
3. Valori assegnati	5
3.1 Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance	6
3.2 Criteri di accettabilità.....	6
4. Elenco dei laboratori partecipanti (in ordine alfabetico).....	6
5. Risultati.....	6
5.1 Emissione report parziale.....	6
5.2 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare	6
<i>Tabella 2. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio AQUA RV-D: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.</i>	7
<i>Tabella 3. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito del circuito interlaboratorio RV-D: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.</i>	7
5.3 Risultati ottenuti mediante metodica di biologia molecolare per l'identificazione della specie ospite.....	7
<i>Tabella 4. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio AQUA RV-D: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite</i>	7
6. Discussione e raccomandazioni	8
7. Informativa sulla privacy	8



Report definitivo

Introduzione

Il centro di referenza nazionale per la rabbia (CRN), nell'ambito delle proprie responsabilità, organizza un circuito interlaboratorio per la diagnosi di rabbia animale, con l'obiettivo di valutare e armonizzare le prestazioni tecniche dei laboratori nazionali sulle metodiche di riferimento.

Il requisito minimo per partecipare al circuito è stata la dichiarazione, da parte del laboratorio partecipante, che il personale coinvolto nelle prove sia stato vaccinato e presenti un titolo anticorpale post vaccinale superiore a 0,5 UI/ml con verifica dello stesso effettuata da un massimo di sei mesi (D. Lgs. 9 aprile 2008, n.81).

Lo schema RV-D 1-23 "Identificazione del virus della rabbia e identificazione della specie mammifero ospite di infezione" prevede l'identificazione tramite l'utilizzo di metodiche biomolecolari (i) di virus appartenenti al genere *Lyssavirus* e (ii) della specie ospite di infezione.

Allo schema RV-D 1-23 si sono iscritti 6 laboratori appartenenti alla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (I.Z.Z.SS.). Di questi, 5 laboratori hanno portato a termine la prova e 1 laboratorio non ha presentato i risultati, pertanto non è stato inserito nell'elaborazione statistica del presente report.

I laboratori, al momento dell'iscrizione al circuito interlaboratorio AQUA, sono resi anonimi e identificati tramite codici alfa-numeriche (L000XXX). Al fine di tutelare la riservatezza dei dati negli anni, nel report definitivo ad ogni laboratorio è stato assegnato in modo casuale dal gestionale Aquaweb un codice identificativo numerico (1,2,3, etc) specifico solo per questo report.

Tutti gli operatori dell'Organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA RV-D sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse. In alcune circostanze, particolari autorità (ad es. Regione) possono richiedere all'Ente organizzatore del circuito, di riferire sulle performance; in tale caso, i partecipanti vengono informati di questa possibilità per iscritto.

1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni

1.1 Composizione dei campioni prova

Per lo schema RV-D 1-23, sono stati forniti 13 campioni prova, identificati da un codice alfanumerico e inviati a ciascun laboratorio partecipante. Al fine di ottenere campioni prova simili alla matrice esaminata nella routine diagnostica, gli stessi sono stati ottenuti a partire da encefali di mammiferi conferiti dal territorio e precedentemente identificati come negativi per la rabbia.

Nello specifico, i campioni positivi sono stati ottenuti aggiungendo all'encefalo di mammifero RNA sintetico del leader e gene codificante per la nucleoproteina di *lyssavirus* (3'UTR e gene N; 1522 – 1828 paia di basi).

I campioni negativi sono stati ottenuti da encefalo di mammifero senza aggiunta di RNA sintetico.

È stata richiesta inoltre l'identificazione genetica della specie ospite al fine di armonizzare la sorveglianza di *lyssavirus* nei chiroteri. A tale scopo, ogni campione costituente il pannello, positivo o negativo per *lyssavirus*, era composto da encefalo di una sola specie di mammifero.

La **tabella 1** riporta la composizione del pannello.

Tabella 1: Composizione del pannello dello schema AQUA RV-D 1-23

Virus	Lineaggio	Origine	Specie Ospite
European Bat Lyssavirus	1b	Francia	<i>Canis lupus</i>
Duvenhage Virus	n.a.	Sud Africa	<i>Vulpes Vulpes</i>
Bokeloh Bat Lyssavirus	n.a.	Francia	<i>Canis lupus</i>
Ikoma Lyssavirus	n.a.	Tanzania	<i>Vulpes Vulpes</i>
Lleida Bat Lyssavirus	n.a.	Francia	<i>Vulpes Vulpes</i>
n.a.	n.a.	n.a.	<i>Felis catus</i>

1.2 Prove di omogeneità e stabilità

Le prove di omogeneità e stabilità sono state eseguite con le seguenti metodiche:

- Rabbia Virus: Identificazione e tipizzazione di Lyssavirus mediante one step RT-PCR e sequenziamento Sanger
PDP VIR 034 rev.01
- Rilevazione di RNA di Lyssavirus mediante Real Time RT-PCR (rRT-PCR)
PDP VIR 035 rev. 03
- Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI)
PDP DIA 175 rev. 01

I campioni prova sono risultati omogenei e stabili in quanto concordi con il risultato atteso.

Le informazioni relative alle prove di stabilità e omogeneità sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzatore.

2. Invio e istruzioni per la preparazione e utilizzo dei campioni prova

Le istruzioni fornite in merito alla preparazione dei campioni prevedevano di risospendere il campione in 0,5 ml di acqua distillata sterile, utilizzando una siringa monouso per ciascuna provetta prima dell'esecuzione della prova.

Per ulteriori specifiche si faccia riferimento alle indicazioni in AQUAWEB, all'interno dell'area riservata di ciascun laboratorio.

Il partecipante era tenuto ad utilizzare una metodica di biologia molecolare a scelta tra quella suggerita dal CRN (PDP VIR 035) o una metodica disponibile per la diagnosi di rabbia e lyssavirus.

Per quanto riguarda l'identificazione della specie ospite il partecipante poteva scegliere se applicare la metodica suggerita dal CRN (PDP DIA 175) o altra metodica disponibile.

Periodo per l'esecuzione delle prove: dal 21/03/2023 al 21/04/2023.

Contestualmente all'invio dei campioni, ciascun laboratorio partecipante è stato invitato a visionare e/o compilare la seguente documentazione disponibile in Aquaweb:

- Modulo di conferma della ricezione del pannello
- Istruzioni per la corretta procedura di analisi e conservazione dei liofilizzati

3. Valori assegnati

Per le prove qualitative (metodiche biomolecolari), il valore assegnato coincide con il valore atteso che è definito dall'organizzatore del circuito, in quanto derivante dalla conoscenza della preparazione dei campioni di prova da analizzare e/o dall'utilizzo di materiale di riferimento.

*IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per la rabbia
Report definitivo emesso il 20/07/2023*

Per questa tipologia di circuiti interlaboratorio, 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 la gestione di valori anomali ed errori grossolani in quanto non appropriate alla tipologia di risposta richiesta dal circuito interlaboratorio

3.1 Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance

Per ogni laboratorio partecipante è stata calcolata la statistica K di Cohen, che indica il grado di accordo tra i risultati forniti dal laboratorio in esame e gli esiti attesi, fornendo una valutazione individuale di performance. La statistica K è stata anche calcolata per valutare il grado di accordo tra i laboratori partecipanti, fornendo in questo modo una valutazione di performance dell'intero circuito. Tale calcolo è stato eseguito sugli esiti qualitativi ottenuti mediante rRT-PCR per i laboratori in grado di effettuare quest'ultima analisi. Ad ogni valore di K è associata la significatività (*p-value*) che indica se l'accordo osservato è reale o semplicemente dovuto al caso. A scopo interpretativo della statistica K, si suggerisce l'utilizzo della scala di *Landis & Koch* così strutturata:

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

3.2 Criteri di accettabilità

La prestazione dei laboratori che abbiano raggiunto almeno una concordanza BUONA (K=0,61-0,80) è ritenuta ACCETTABILE per il circuito interlaboratorio AQUA RV-D. Tuttavia, indipendentemente dal valore di concordanza ottenuto, l'esito del circuito è considerato NON FAVOREVOLE per quei laboratori che abbiano fallito nell'identificazione di uno o più campioni positivi (presenza di uno o più FALSI NEGATIVI), considerata la rilevanza in termini di sanità pubblica della mancata identificazione di un caso di rabbia.

4. Elenco dei laboratori partecipanti (in ordine alfabetico)

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana, IZSLT, sede di Roma
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, IZSLER, sede di Brescia
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, IZS MEZZOGIORNO, sede di Portici
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, IZSPLV, sede di Torino
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, IZS SICILIA, sede Palermo

5. Risultati

5.1 Emissione report parziale

È stato pubblicato in AQUAWEB, all'interno dell'area riservata di ciascun laboratorio, un report parziale il 26/04/2023, contenente esclusivamente l'esito atteso.

5.2 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare per la diagnosi di lyssavirus

I risultati sono stati trasmessi da 5 laboratori; tutti hanno identificato correttamente i campioni (**tabella 2**).

La statistica K calcolata per valutare le prestazioni di ciascun partecipante indica che i 5 laboratori partecipanti hanno tutti ottenuto una concordanza ottima. Il valore di concordanza complessivo del circuito per tale metodica è risultato pari a 1,00 (valore K) e 0,00 (*p-value*) (**tabella 3**).

Tabella 2. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio AQUA RV-D 1-23: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.

Identificativo campione	ATTESO	1	2	3	4	5
C01	P	P	P	P	P	P
C02	N	N	N	N	N	N
C03	P	P	P	P	P	P
C04	N	N	N	N	N	N
C05	P	P	P	P	P	P
C06	N	N	N	N	N	N
C07	P	P	P	P	P	P
C08	N	N	N	N	N	N
C09	P	P	P	P	P	P
C10	P	P	P	P	P	P
C11	P	P	P	P	P	P
C12	N	N	N	N	N	N
C13	P	P	P	P	P	P

Tabella 3. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito del circuito interlaboratorio RV-D 1-23: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.

Statistiche	1	2	3	4	5	Complessivo
Kappa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,00
p-value	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,00

5.3 Risultati ottenuti mediante metodica di biologia molecolare per l'identificazione della specie ospite

Nello schema RV-D 1-23, tutti i laboratori partecipanti hanno effettuato l'identificazione della specie ospite espressa mediante nome scientifico: 1-genere 2-specie (es. 1-*Canis* 2-*lupus*) individuati dall'analisi BOLD, inclusa la percentuale di identità (es: *Vulpes vulpes* 99,8%)

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i campioni di prova del pannello. I risultati complessivi sono riportati nella **tabella 4**.

Tabella 4. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio AQUA RV-D 1-23: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite

Identificativo campione	Specie Ospite	1	2	3	4	5
C01	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,8%	<i>Canis lupus</i> 100%
C02	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus/</i> <i>Canis lycaon</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,8%	<i>Canis lupus</i> 100%
C03	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i> 99,33%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,8%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,83%

C04	<i>Felis sp.</i>	<i>Felis catus/Felis silvestris</i> 99,10%	<i>Felis catus</i> 99,38%	<i>Felis silvestris/ Felis catus</i> 99,84%	<i>Felis Sp</i> , 99%	<i>Felis silvestris</i> 99,58%
C05	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus/ Canis lycaon</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,5%	<i>Canis lupus</i> 100%
C06	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus/ Canis lycaon</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,6%	<i>Canis lupus</i> 100%
C07	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i> 99,33%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,5%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,37%
C08	<i>Felis sp.</i>	<i>Felis catus/Felis silvestris</i> 99,10%	<i>Felis catus</i> 99,69%	<i>Felis silvestris/ Felis catus</i> 99,84%	<i>Felis Sp</i> 99%	<i>Felis catus</i> 98,03%
C09	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i> 99,33%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,5%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,31%
C10	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,8%	<i>Canis Lupus</i> 100%
C11	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i> 99,33%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 100%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,8%	<i>Vulpes vulpes</i> 99,58%
C12	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus/ Canis lycaon</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,5%	<i>Canis lupus</i> 100%
C13	<i>Canis sp.</i>	<i>Canis lupus</i> 99,33%	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus/ Canis lycaon</i> 100%	<i>Canis lupus</i> 99,5%	<i>Canis lupus</i> 100%

6. Discussione e raccomandazioni

Nell'ambito dello schema AQUA-RV-D 1-23, il CRN ha proposto ai laboratori partecipanti l'utilizzo esclusivo di metodiche di biologia molecolare per la diagnosi della rabbia. Dal 2018, la diagnosi molecolare è stata infatti annoverata a tutti gli effetti nell'ambito del Manuale WOA (ex OIE) come metodica gold standard anche per la diagnosi della rabbia, con la raccomandazione che le metodiche utilizzate siano validate nei confronti di un target ampio che comprenda potenzialmente tutte le specie appartenenti al genere *Lyssavirus* oltre al virus della rabbia (*pan-lyssavirus*). Per l'analisi dei campioni prova, i laboratori partecipanti potevano scegliere di applicare un protocollo *in house* (ovvero già disponibile e in uso) o quello suggerito dal CRN con protocollo real-time (PDP VIR 035).

Per lo schema AQUA RV-D 1-23, si attesta una partecipazione maggiore benché non completa dei laboratori afferenti alla rete degli II.ZZ.SS. e deputati alla diagnosi di rabbia di prima istanza.

I risultati dello schema AQUA RV-D 1-23 attestano un'ottima competenza dei cinque laboratori partecipanti con un'accuratezza complessiva del 100,00% e con una K= 1,00.

I 5 laboratori hanno anche partecipato allo schema nell'ambito della prova di identificazione genetica della specie ospite. Benché non si tratti di una prova diagnostica per la rabbia, la corretta identificazione dell'ospite risulta di fondamentale importanza nell'ambito della sorveglianza di *Lyssavirus* nei chiroteri, ordine di mammiferi rappresentato in Italia con 34 specie, per le quali l'identificazione morfologica è difficile e prona ad errori.

7. Informativa sulla privacy

Ai sensi degli artt. 13 e 14 Reg UE 2016/679 si rende la presente informativa privacy.

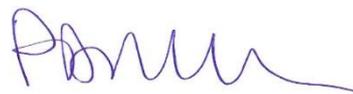
Titolare del trattamento: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE (in sigla IZSVE), con sede legale in 35020 LEGNARO (PD), Viale dell'Università 10, C.F. e P.IVA 00206200289, in persona del Direttore generale e legale rappresentante pro tempore tel 0498084242, e-mail dirgen@izsvenzie.it. In

IZSVE – Centro di Referenza Nazionale per la rabbia
Report definitivo emesso il 20/07/2023

particolare, i dati verranno trattati dal personale delle strutture complesse che erogano il circuito AQUA. Responsabile della protezione dei dati dell'IZSVe ai sensi dell'art. 37 GDPR (RPD/DPO), contattabile all'indirizzo e-mail dpo@izsvenezie.it.

Tipologia di dati e fonti: dati comuni, anagrafici e identificativi. Provengono tutti dall'Interessato. Finalità e modalità: i dati saranno trattati per l'adempimento di obblighi legali connessi all'iscrizione / adesione al circuito Aqua; il trattamento avverrà in modo sia manuale/cartaceo, che elettronico. Base giuridica: il trattamento si fonda, oltre che sul consenso manifestato tramite conferimento volontario dei dati, sull'adempimento di un obbligo contrattuale nonché sul legittimo interesse del Titolare. Obbligatorietà: il conferimento dei dati è obbligatorio e la sua mancanza comporta l'impossibilità per il Titolare di eseguire la prestazione richiesta e di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua. Destinatari: i dati potranno essere comunicati a soggetti all'uopo Incaricati dal Titolare, a Responsabili del trattamento e consulenti del Titolare. Conservazione: i dati saranno conservati fino a revoca del consenso. Diritti: l'Interessato può esercitare i suoi diritti di accesso, rettifica, cancellazione, limitazione, portabilità, opposizione via email ai dati del Titolare di cui sopra. Reclamo: l'Interessato può proporre reclamo al Garante per la protezione dei dati personali. Revoca: il consenso può essere revocato, ma ciò potrebbe comportare l'impossibilità di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua o la cancellazione dell'iscrizione al circuito medesimo.

Data report definitivo 20/07/2023



Il Responsabile del Circuito Interlaboratorio AQUA RV-D
Dr.ssa Paola De Benedictis

----- Fine report -----