

PROFICIENCY TESTING AQUA RV-D

Diagnosi della rabbia

Report	Finale – ri-emissione
Schema	AQUA RV-D 1-26
Anno di erogazione	2026
Periodo di esecuzione	04/05/2026 – 12/06/2026
Data emissione	28/07/2026
Data ri-emissione	03/08/2026
ID report	AQRVD1-26FR

ORGANIZZATORE	Centro di Riferenza Nazionale (CRN) per la rabbia Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) Viale dell'Università 10 Legnaro (Padova) - Italia www.izsvenezie.it
RESPONSABILE PT	Paola De Benedictis pdebenedictis@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084385
RESPONSABILE TECNICO	Barbara Zecchin Bazecchin@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084387
RESPONSABILE STATISTICO	Marzia Mancin mmancin@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084431
SEGRETERIA	Paola Mozzi aqua-rv@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084369-371

Riservatezza

I laboratori partecipanti, al momento dell'iscrizione al PT AQUA, sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric (L000XXX). Al fine di tutelare la riservatezza dei dati negli anni, nel report finale 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 PT sono tenuti alla riservatezza sia relativamente all'identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

NOTA:

Il presente report annulla e sostituisce il report finale precedentemente pubblicato.

Si modifica in tabella 5 per i campioni C09, C10 e C11 la specie ospite erroneamente riportata come "*Felis lupus*" al posto di "*Felis catus*". Le parti modificate sono evidenziate in giallo.

Layout report: IZS MOD 501 RV-D – rev 04 – 04/26 - Report AQUA RV-D

Sommario

Introduzione	5
1. Materiali e Metodi.....	5
1.1 Proprietà e composizione dei campioni.....	5
1.2 Valore assegnato.....	5
1.3 Controlli qualità.....	6
1.4 Distribuzione	6
1.5 Analisi dei campioni.....	6
1.6 Comunicazione dei risultati	6
1.7 Valutazione dei risultati.....	6
2. Risultati	8
2.1 Schema AQUA RV-D 1-26	8
2.1.1 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare per la diagnosi di lyssavirus	8
2.1.2 Risultati ottenuti mediante metodica di biologia molecolare per l'identificazione della specie ospite ..	8
3. Discussioni e conclusioni del PT.....	10
Bibliografia	11

Abbreviazioni

CNR	Centro di Referenza Nazionale
CVS-11	Challenge virus strain 11
PT	Proficiency Testing
RABV	Rabbia virus
rRT-PCR	Real time RT-PCR
RT-PCR	One step PCR

Introduzione

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

Per aderire al PT il personale del laboratorio partecipante coinvolto nelle prove deve essere vaccinato e avere un titolo anticorpale post vaccinale superiore a 0,5 UI/ml con verifica dello stesso effettuata da un massimo di sei mesi (D. Lgs. 9 aprile 2008, n.81).

Lo schema RV-D 1-26 "Identificazione del virus della rabbia e identificazione della specie mammifero ospite di infezione" prevedeva l'identificazione tramite l'utilizzo di metodiche biomolecolari (i) di virus appartenenti al genere lyssavirus e (ii) della specie ospite di infezione.

Cinque (5) laboratori hanno aderito all'edizione 2026 dello schema RV-D 1-26; i campioni sono stati spediti il 04/05/2026. Nessuna anomalia rispetto a contenuto e condizione dei campioni è stata segnalata dai partecipanti.

L'esercizio si è svolto dal 04/05/2026 al 12/06/2026, data di scadenza per la presentazione dei risultati.

In data 18/06/2026 è stato pubblicato in AQUAWEB il report preliminare contenente la composizione dei campioni e i valori assegnati.

1. Materiali e Metodi

1.1 Proprietà e composizione dei campioni

Sono stati inviati a ciascun laboratorio partecipante tredici (13) campioni prova, identificati da un codice alfanumerico. I campioni sono stati tutti ottenuti da encefali di mammifero conferito al CRN e precedentemente identificati come negativi per la rabbia, stabilizzati e inattivati in medium di trasporto commerciale. Ai campioni prova positivi è stata aggiunta una quantità nota di lyssavirus. È stata richiesta 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: Informazioni sulla composizione del pannello dello schema RV-D 1-26.

Virus	Specie Ospite
European Bat Lyssavirus 1	<i>Vulpes vulpes</i>
Duvenhage Virus	<i>Felis catus</i>
Lleida bat Lyssavirus	<i>Vulpes vulpes</i>
Rabies virus	<i>Felis catus</i>
Negativo	<i>Canis lupus</i>
Negativo	<i>Felis catus</i>

1.2 Valore assegnato

Il valore assegnato coincide con il valore atteso che è stato determinato utilizzando procedure analitiche raccomandate che garantiscono l'accuratezza e la precisione dei risultati. Questi metodi sono elencati nella **Tabella 2**.

Per i PT qualitativi, 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 PT.

1.3 Controlli qualità

Il controllo qualità è stato eseguito in conformità alle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2024 e UNI ISO 13528:2022, utilizzando i metodi contrassegnati dal simbolo * in **Tabella 2**.

I campioni prova risultano 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.

1.4 Distribuzione

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

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 campioni.

La conferma di ricezione e integrità del pannello è stata inviata da cinque (5) laboratori all'ente organizzatore.

1.5 Analisi dei campioni

I partecipanti sono stati invitati a testare i campioni utilizzando i loro metodi analitici di routine, purché conformi a quelli definiti dall'Organizzazione. Sia per l'identificazione del virus che per quella della specie ospite, il partecipante era libero di utilizzare o meno le metodiche suggerite dal CRN.

I campioni sono stati forniti pronti per essere processati mediante estrazione degli acidi nucleici. Per ulteriori specifiche è possibile fare riferimento alle indicazioni in AQUAWEB, all'interno dell'area riservata di ciascun laboratorio.

1.6 Comunicazione dei risultati

I risultati sono stati trasmessi attraverso il portale AQUAWEB. Per essere valutati, i risultati dovevano essere consegnati entro il termine stabilito.

1.7 Valutazione dei risultati

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 PT. 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

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

Tabella 2. Metodi usati per assegnare i valori target ai campioni e la conformità alle prove di omogeneità e stabilità (identificati dal simbolo *).

Schema	Misurando	Metodo
AQUA RV-D 1	Rabbia/Lyssavirus/Specie ospite	Rilevazione di RNA di Lyssavirus mediante Real time RT-PCR (rRT-PCR) (PDP VIR 035 2023 rev 3)*
		Identificazione e tipizzazione di Lyssavirus mediante one step RT-PCR e sequenziamento Sanger (PDP VIR 034 2024 rev 2)*
		Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI) (PDP DIA 175 2021 rev 1)*

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

2. Risultati

2.1 Schema AQUA RV-D 1-26

2.1.1 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare per la diagnosi di Iyssavirus

I risultati sono stati trasmessi da cinque (5) laboratori. Tutti sono stati in grado di identificare correttamente tutti i campioni come positivi oppure negativi (**Tabella 3**).

La statistica K calcolata per valutare le prestazioni di ciascun partecipante indica che tutti i laboratori partecipanti hanno ottenuto una concordanza ottima. Il valore di concordanza complessivo del PT per tale metodica è risultato pari a 1 (valore K) e 0,0000 (p-value) (**Tabella 4**).

Tabella 3. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti allo schema RV-D 1-26: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	VALORE ASSEGNATO	ESITO LABORATORIO PARTECIPANTE				
		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	P	P	P	P	P	P
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	N	N	N	N	N	N
C11	N	N	N	N	N	N
C12	P	P	P	P	P	P
C13	P	P	P	P	P	P

Tabella 4. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito dello schema RV-D 1-26: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.

STATISTICHE	LABORATORIO PARTECIPANTE					COMPLESSIVO
	1	2	3	4	5	
Kappa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0000

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

Nello schema RV-D 1-26, 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, ma solo quattro (4) laboratori su cinque (5) hanno indicato 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 5**.

Tabella 5. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti allo schema RV-D 1-26: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite.

ID	SPECIE OSPITE	ESITO LABORATORIO PARTECIPANTE														
		1			2			3			4			5		
		Genere	Specie	Identità	Genere	Specie	Identità	Genere	Specie	Identità	Genere	Specie	Identità	Genere	Specie	Identità
C01	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,08%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	99,70%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	97%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C02	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	99,75%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	100%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	100%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	92,5%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	--
C03	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,93%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	97%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C04	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	99,49%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	100%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	100%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	89%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	--
C05	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	99,23%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	89%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C06	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	99,00%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C07	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	98,64%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	100%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	100%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	91,3%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	--
C08	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	98,46%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	100%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	100%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	98,8%	<i>Canis</i>	<i>lupus</i>	--
C09	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,05%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	99,69%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C10	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	99,05%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,9%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C11	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,73%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,9%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--
C12	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	99,22%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	100%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	100%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	98,1%	<i>Vulpes</i>	<i>vulpes</i>	--
C13	<i>Felis catus</i>	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	99,51%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	100%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	98,9%	<i>Felis</i>	<i>catus</i>	--

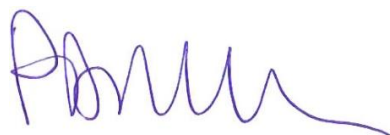
3. Discussioni e conclusioni del PT

Nell'ambito dello schema AQUA-RV-D 1-26, 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 1-26, si attesta una buona partecipazione benché non completa dei laboratori afferenti alla rete degli IZSV e deputati alla sorveglianza passiva dei chiroteri per *lyssavirus*.

I risultati dello schema AQUA RV-D 1-26 attestano un'ottima competenza dei cinque laboratori partecipanti con un'accuratezza complessiva del 100,00% e con una $K=1,0000$.

I cinque (5) laboratori hanno anche partecipato allo schema nell'ambito della prova di identificazione genetica della specie ospite. A questo proposito si sottolinea che la corretta identificazione dell'ospite è di fondamentale importanza nell'ambito della sorveglianza di *lyssavirus* nei chiroteri, ordine di mammiferi rappresentato in Italia con numerose specie, per le quali l'identificazione morfologica è difficile e prona ad errori.



Data report finale **ri-emissione:** 03/08/2026

Dr.ssa Paola De Benedictis
Responsabile Proficiency Testing AQUA RV-D

Bibliografia

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura

UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2024 Valutazione della conformità – Requisiti generali per la competenza dei provider di prove valutative interlaboratorio

UNI ISO 13528:2022 Metodi statistici utilizzati nelle prove valutative mediante confronti interlaboratorio

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