

PROFICIENCY TESTING AQUA RV-D

Diagnosi della rabbia

Report	Finale
Schema	AQUA RV-D 2-26
Anno di erogazione	2026
Periodo di esecuzione	01/04/2026 – 29/04/2026
Data emissione	30/06/2026
ID report	AQRVD2-26F

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-numerici (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.

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 2-26	8
2.1.1 Risultati ottenuti mediante metodica IF	8
2.1.2 Risultati ottenuti mediante metodica RTCIT	8
2.1.3 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare rRT-PCR	9
3. Discussioni e conclusioni del PT	10
Bibliografia	11
APPENDICE I**	12
Schema AQUA RV-D 2	13
I.1 Quantificazione dell'antigene virale	13
I.2 Risultati della quantificazione dell'antigene virale	13

Abbreviazioni

CNR	Centro di Referenza Nazionale
CVS-11	Challenge virus strain 11
IF	Immunofluorescenza diretta
PT	Proficiency Testing
RABV	Rabbia virus
rRT-PCR	Real time RT-PCR
RTCIT	Isolamento su colture cellulari

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 2-26 "Isolamento ed identificazione del virus della rabbia" prevedeva l'identificazione dell'antigene virale del virus della rabbia nei carnivori applicando obbligatoriamente la metodica di immunofluorescenza diretta e rRT-PCR. I laboratori potevano opzionalmente testare i campioni mediante isolamento su colture cellulari del virus della rabbia (RTCIT).

Otto (8) laboratori hanno aderito all'edizione 2026 dello schema RV-D 2-26; i campioni sono stati spediti il 24/03/2026 per garantire che tutti i partecipanti li ricevessero in tempo per iniziare l'esercizio. Nessuna anomalia rispetto a contenuto e condizione dei campioni è stata segnalata dai partecipanti.

L'esercizio si è svolto dal 01/04/2026 al 29/04/2026, data di scadenza per la presentazione dei risultati.

In data 05/05/2026 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 tredici (13) campioni prova, identificati da un codice alfanumerico e inviati a ciascun laboratorio partecipante. I campioni prova positivi sono stati ottenuti sperimentalmente a partire da monostrati cellulari infettati con lyssavirus e omogenati a encefali di mammifero conferiti al CRN e precedentemente identificati come negativi per la rabbia. I campioni negativi sono stati ottenuti da encefali di mammifero conferito al CRN e precedentemente identificati come negativi per la rabbia.

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

Tabella 1: Informazioni sulla composizione del pannello dello schema RV-D 2-26.

Virus	Lineaggio	Origine
RABV	Africa 1	Italia ex-Zanzibar 2019
RABV	Africa 2	Niger 2007
RABV	Africa 3	Botswana 2009
RABV	CVS-11	--

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 8 (otto) 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. L'esito del test di immunofluorescenza diretta (IF), *gold standard* per la diagnosi della rabbia (WOAH, 2023), è di tipo qualitativo, inteso come positivo oppure negativo. Ad ogni laboratorio partecipante è stato inoltre richiesto di assegnare un numero da 1 a 4 indicante la quantità (proporzionalmente crescente) di reazione di immunofluorescenza specifica osservata in ogni campione prova, assumendo come riferimento il controllo positivo con reazione pari a 3-4. La prova di valutazione quantitativa dell'antigene virale non è stata considerata ai fini della determinazione dell'esito delle performance di ciascun laboratorio, ma solo come valutazione addizionale di carattere informativo (**APPENDICE I**).

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 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, nei tempi previsti.

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 2	Rabbia/Lyssavirus	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)*
		WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.19 par B.1.3.1.i 2023*
		WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap 3.1.19 par B.1.3.2.i 2023*

* 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 2-26

2.1.1 Risultati ottenuti mediante metodica IF

I risultati sono stati trasmessi da otto (8) laboratori. Il Laboratorio 1 ha tuttavia riportato risultati esclusivamente per la metodica IF, in difformità ai requisiti di partecipazione previsti dallo schema. Di conseguenza, i risultati sono riportati nel presente rapporto esclusivamente a fini informativi e non sono stati oggetto di valutazione delle prestazioni né considerati ai fini dell'esito dello schema.

Tutti i partecipanti sono stati in grado di identificare correttamente tutti i campioni come positivi oppure negativi mediante IF (**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 1,0000 (valore K) e 0.0002 (p-value) (**Tabella 4**).

Tabella 3. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti allo schema RV-D 2-26: metodica IF.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	VALORE ASSEGNATO	ESITO LABORATORIO PARTECIPANTE							
		1	2	3	4	5	6	7	8
V1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V2	N	N	N	N	N	N	N	N	N
V3	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V4	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V5	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V6	N	N	N	N	N	N	N	N	N
V7	N	N	N	N	N	N	N	N	N
V8	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V9	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V10	N	N	N	N	N	N	N	N	N
V11	P	P	P	P	P	P	P	P	P
V12	N	N	N	N	N	N	N	N	N
V13	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Tabella 4. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito dello schema RV-D 2-26: metodica IF.

STATISTICHE	LABORATORIO PARTECIPANTE								COMPLESSIVO
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Kappa	/	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	/	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,00

2.1.2 Risultati ottenuti mediante metodica RTCIT

Nello schema RV-D 2-26, un unico laboratorio ha partecipato anche mediante prova di isolamento virale su coltura cellulare. Il laboratorio è stato in grado di identificare correttamente tutti i campioni diagnostici come positivi oppure negativi mediante RTCIT.

La statistica K calcolata per valutare la performance del laboratorio nell'isolamento virale su coltura cellulare indica che l'ente partecipante ha ottenuto "ottima" concordanza con l'esito atteso. In presenza di un solo laboratorio, il calcolo del kappa complessivo non può essere effettuato, pertanto non viene fornito (**Tabella 5 e 6**).

Tabella 5. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti allo schema RV-D 2-26: isolamento virale in colture cellulari mediante RTCIT.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	VALORE ASSEGNATO	ESITO LABORATORIO PARTECIPANTE
		2
V1	P	P
V2	N	N
V3	P	P
V4	P	P
V5	P	P
V6	N	N
V7	N	N
V8	P	P
V9	P	P
V10	N	N
V11	P	P
V12	N	N
V13	P	P

Tabella 6. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito dello schema RV-D 2-26: isolamento virale in colture cellulari mediante RTCIT.

STATISTICHE	LABORATORIO PARTECIPANTE	COMPLESSIVO
	2	
Kappa	1,0000	N.A.
p-value	0,0002	N.A.

2.1.3 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare rRT-PCR

Nello schema RV-D 2-26, sette (7) laboratori sono stati in grado di identificare correttamente tutti i campioni diagnostici come positivi oppure negativi mediante rRT-PCR. I risultati complessivi della prova sono riportati nella **Tabella 7**.

La statistica K calcolata per valutare le prestazioni di ogni laboratorio, indica che i laboratori partecipanti hanno mostrato "ottima" concordanza con l'esito atteso. Considerando i dati complessivi di tutti i laboratori, il valore di concordanza dell'intero PT è risultato pari a 1,0000 ($p=0,0000$) (**Tabella 8**).

Tabella 7. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti allo schema RV-D 2-26: rRT-PCR.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	VALORE ASSEGNATO	ESITO LABORATORIO PARTECIPANTE						
		2	3	4	5	6	7	8
V1	P	P	P	P	P	P	P	P
V2	N	N	N	N	N	N	N	N
V3	P	P	P	P	P	P	P	P
V4	P	P	P	P	P	P	P	P
V5	P	P	P	P	P	P	P	P
V6	N	N	N	N	N	N	N	N
V7	N	N	N	N	N	N	N	N
V8	P	P	P	P	P	P	P	P
V9	P	P	P	P	P	P	P	P
V10	N	N	N	N	N	N	N	N
V11	P	P	P	P	P	P	P	P
V12	N	N	N	N	N	N	N	N
V13	P	P	P	P	P	P	P	P

Tabella 8. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito dello schema RV-D 2-26: rRT-PCR.

STATISTICHE	LABORATORIO PARTECIPANTE							COMPLESSIVO
	2	3	4	5	6	7	8	
Kappa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
p-value	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002

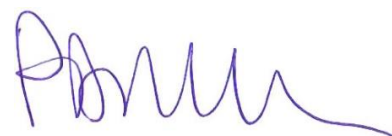
3. Discussioni e conclusioni del PT

I risultati dello schema RV-D 2-26 hanno dimostrato il mantenimento delle performance dei laboratori. Con un'accuratezza del 100% nell'identificazione dell'antigene virale mediante IF, il grado di accordo tra i laboratori partecipanti è stato complessivamente "ottimo".

Il CRN per la rabbia tiene a sottolineare che nell'ambito dello schema AQUA RV-D 2 si richiede di analizzare i campioni utilizzando obbligatoriamente due metodiche: test IF e rRT-PCR. Questa richiesta nasce dalla necessità che i laboratori coinvolti nella diagnosi di rabbia nei carnivori siano in grado di applicare le due metodiche in parallelo per tutti i casi nei carnivori domestici e nei selvatici morsicatori.

Va inoltre menzionata l'importanza di un'adeguata pianificazione delle attività da parte dei laboratori partecipanti al fine di garantire il rispetto delle tempistiche previste dallo schema.

Il CRN mette a disposizione dei partecipanti un servizio di *follow-up* per il quale il partecipante potrà fare richiesta allo scopo di mettere in atto eventuali misure correttive/migliorative o di adeguamento delle metodiche.



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

Data report finale: 30/06/2026

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

APPENDICE I**

Schema AQUA RV-D 2.....	12
-------------------------	----

** I risultati e i dati riportati nella presente appendice non sono oggetto di accreditamento ACCREDIA. Sono raccolti ed elaborati esclusivamente a scopo informativo e per l'autovalutazione da parte dei partecipanti. In alcuni casi, possono aiutare a interpretare i risultati.

Schema AQUA RV-D 2

In analogia con altri test interlaboratorio per la diagnosi della rabbia mediante metodica di immunofluorescenza e al fine di identificare eventuali criticità, il Responsabile del PT AQUA RV- D ritiene utile dare indicazioni sul valore di immunofluorescenza rilevato, attraverso la stima della quantificazione dell'antigene virale.

I.1 Quantificazione dell'antigene virale

I risultati di quantificazione dell'antigene virale mediante test IF ottenuti per ogni campione analizzato, sono stati comparati a quelli ottenuti dall'organizzatore del PT al fine di fornire un'ulteriore indicazione della prestazione individuale. Tale indicazione è stata ottenuta valutando l'idoneità dell'intensità di fluorescenza riportata dal partecipante, nel seguente modo

- Idonea al 100% nel caso in cui il valore di intensità riportato sia incluso nell'intervallo identificato dal range di accettabilità definito dall'organizzatore del PT (min-max).
- Idonea all'80% nel caso in cui il valore di intensità di fluorescenza esca dall'intervallo identificativo del range di accettabilità (min-max) di una quantità pari a 1.
- Non idonea in tutti gli altri casi.

Il punteggio complessivo viene classificato dal responsabile del PT nel seguente modo:

Punteggio <4 Scarso

Punteggio da 5 a 7 Sufficiente

Punteggio da 8 a 10 Buono

Punteggio da 11 a 13 Ottimo.

La quantificazione del segnale è stata ritenuta soddisfacente quando il punteggio complessivo è >8.

I.2 Risultati della quantificazione dell'antigene virale

La quantificazione dell'antigene virale risulta soddisfacente per i sette (7) laboratori valutabili, che hanno ottenuto tutti un punteggio complessivo "ottimo" (Tabella I1).

Tabella I1. Risultati ottenuti dai singoli laboratori partecipanti allo schema RV-D 2-26: valutazione quantitativa dell'antigene virale mediante IF.

IDENTIFICATIVO CAMPIONE	VALORE ASSEGNATO	RANGE ACCETTABILITÀ		LABORATORIO PARTECIPANTE							
				1	2	3	4	5	6	7	8
V1	P	3	4	4	3	3	4	4	4	2	3
V2	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V3	P	3	4	3	2	4	2	3	4	3	2
V4	P	3	4	2	3	4	3	3	3	4	4
V5	P	3	4	1	4	2	2	3	3	1	1
V6	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V7	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V8	P	3	4	2	2	4	2	2	4	3	4
V9	P	3	4	4	4	2	4	4	4	3	4
V10	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V11	P	3	4	3	2	4	2	3	3	4	4
V12	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V13	P	3	4	1	3	3	2	3	4	4	3
Punteggio				/	12,4	12,6	12	12,8	13	11,8	11,8

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