

Aqua

Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati

Circuito interlaboratorio per la diagnosi della rabbia
Report definitivo schema AQUA RV-D 1-21
Luglio 2021

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

Sommario

Introduzione	4
1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni.....	4
1.1 Composizione dei campioni prova	4
Tabella 1. Composizione del pannello del circuito interlaboratorio AQUA RV-D 1-21	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 di biologia molecolare per la diagnosi di rabbia e lyssavirus	6
Tabella 2. Risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al CI AQUA RV-D 1-21: metodica rRT-PCR per diagnosi di rabbia e lyssavirus	7
Tabella 3. Valori di K e significatività (<i>p-value</i>) ottenuti nell'ambito del CI RV-D 1-21: metodica rRT-PCR per diagnosi di rabbia e lyssavirus.....	7
5.3 Risultati ottenuti mediante metodica di biologia molecolare per l'identificazione della specie ospite	7
Tabella 4. Risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al CI AQUA RV-D 1-21: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite	8
6. Discussione e raccomandazioni	8
7. Informativa sulla privacy	9



Report definitivo

Introduzione

Il centro di riferimento nazionale per la rabbia (CRN), nell'ambito delle proprie responsabilità, ha organizzato un circuito interlaboratorio (CI) 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).

Al circuito 2021, organizzato in un unico schema (RV-D 1-21), hanno partecipato 5 laboratori appartenenti alla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (I.I.ZZ.SS.).

Al fine di tutelare la riservatezza dei dati, nel presente documento i laboratori partecipanti sono resi anonimi e identificati esclusivamente tramite codice alfa-numeric.

Tutti gli operatori dell'Organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA RV-D sono tenuti alla riservatezza relativamente alla identità dei partecipanti e alle informazioni intercorse.

1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni

1.1 Composizione dei campioni prova

Tredici campioni diagnostici, identificati da un codice alfanumerico, sono stati inviati a ciascun laboratorio partecipante. Al fine di ottenere campioni prova simili alla matrice esaminata nella routine diagnostica, i campioni prova sono stati ottenuti a partire da encefali di mammiferi conferiti dal territorio nell'ambito della sorveglianza passiva e precedentemente identificati come negativi per la rabbia.

Nello specifico, i campioni positivi sono stati ottenuti addizionando all'encefalo di mammifero RNA sintetico del gene codificante per la nucleoproteina di lyssavirus (gene N – 1564 paia di basi).

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

I controlli di riferimento positivo e negativo sono stati inviati solo ai partecipanti che ne hanno precedentemente fatto richiesta. Il controllo positivo e negativo di riferimento sono stati ottenuti, rispettivamente, da encefalo di topo infettato sperimentalmente o da encefalo di topo non infetto.

Nell'ambito del circuito 2021 è stata richiesta inoltre l'identificazione genetica della specie ospite al fine di armonizzare la sorveglianza di lyssavirus nei chiroteri, in quanto in Italia ne esistono 34 specie difficilmente identificabili morfologicamente. Il livello di dettaglio richiesto in questo caso era: 1-genere 2-specie da esprimere con testo (es. 1-Canis 2-lupus, 1-Felis 2-catus) e il riferimento alla sequenza trovata in banca dati più simile a quella prodotta dal laboratorio partecipante. A tale scopo, ogni campione costituente il pannello, positivo o negativo per lyssavirus, era composto da encefalo di una specie di mammifero. La prova di identificazione genetica della specie ospite è di carattere informativo, non soggetta quindi a elaborazione e valutazione di performance del partecipante.

La **tabella 1** riporta la composizione del pannello del CI 2021.

Tabella 1. Composizione del pannello del circuito interlaboratorio AQUA RV-D 1-21

Virus	Lineaggio	Origine	Specie ospite
West Caucasian Bat Virus	n.a.	Italia 2020	<i>Felis catus</i>
Rabies Virus	Africa 2	Guinea 2018	<i>Vulpes vulpes</i>
Duvenhage Virus	n.a.	Sud Africa 2012	Martes spp.
n.a.	n.a.	n.a.	<i>Canis lupus</i>

n.a. = non attribuibile

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. 02
- Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI)
PDP DIA 175 rev. 00

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 sono state fornite in AQUAWEB, all'interno dell'area riservata di ciascun laboratorio. In sintesi, ciascun campione prova doveva essere risospeso in 0,5 ml di acqua distillata sterile, utilizzando una siringa monouso per ciascuna provetta prima dell'esecuzione della prova.

Il partecipante era tenuto ad utilizzare una metodica di biologia molecolare a scelta tra quella suggerita dal CRN (PDP VIR 035 - Rilevazione di RNA di Lyssavirus mediante Real Time RT-PCR (rRT-PCR)) o una metodica *in house* per la diagnosi di rabbia e lyssavirus.

Per quanto riguarda l'identificazione della specie ospite il partecipante poteva scegliere se applicare oppure no la metodica suggerita dal CRN (PDP DIA 175 - Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI)) o altra metodica disponibile.

Periodo per l'esecuzione delle prove: dal 22/03/2021 al 05/05/2021, comprensivo della proroga di una settimana concessa a tutti i partecipanti.

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.

La conferma di ricezione e integrità del pannello è stata inviata da tutti i laboratori partecipanti all'ente organizzatore entro 2 giorni dall'invio.

3. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale mediante tecniche di biologia molecolare del CI AQUA RV-D 1-21, il valore assegnato coincide con il valore atteso che è definito dall'organizzatore del circuito, in quanto

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

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 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. 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 CI AQUA RV-D 1-21.

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 dell'Abruzzo e del Molise, IZSAM, sede Teramo
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana, IZSLT, sede di Roma
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, IZS MEZZOGIORNO, sede di Portici
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, IZS SICILIA, sede di Palermo
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, IZSUM, sede di Perugia

5. Risultati

5.1 Emissione report parziale

È stato pubblicato in AQUAWEB, all'interno dell'area riservata di ciascun laboratorio, un report parziale il 17/05/2021, contenente esclusivamente l'esito atteso.

5.2 Risultati ottenuti mediante metodica di biologia molecolare per la diagnosi di rabbia e lyssavirus

Tre dei cinque laboratori partecipanti sono stati in grado di identificare correttamente tutti i campioni diagnostici come positivi oppure negativi. Un laboratorio ha ottenuto un esito non corretto per un solo campione del pannello (falso positivo). Un laboratorio non ha effettuato alcuna analisi. I risultati complessivi sono riportati nella **tabella 2**.

IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per la rabbia
Report definitivo del 30/07/2021

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 circuito è risultato pari a 0,917 ($p=0,000$) (**tabella 3**).

Tabella 2. Risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al CI AQUA RV-D 1-21: metodica rRT-PCR per diagnosi di rabbia e lyssavirus

Identificativo campione	ATTESO	L000438	L000545	L000549	L000633	L000635
C1	P	P	P	P	n.e.	P
C2	P	P	P	P	n.e.	P
C3	N	N	N	N	n.e.	N
C4	P	P	P	P	n.e.	P
C5	P	P	P	P	n.e.	P
C6	N	N	N	N	n.e.	N
C7	P	P	P	P	n.e.	P
C8	N	N	N	N	n.e.	N
C9	P	P	P	P	n.e.	P
C10	N	N	P	N	n.e.	N
C11	N	N	N	N	n.e.	N
C12	P	P	P	P	n.e.	P
C13	P	P	P	P	n.e.	P

n.e. = non eseguito.

Tabella 3. Valori di K e significatività (p -value) ottenuti nell’ambito del CI RV-D 1-21: metodica rRT-PCR per diagnosi di rabbia e lyssavirus

Statistiche	L000438	L000545	L000549	L000633	L000635	Complessivo
Kappa	1,0000	0,8312	1,0000	n.c.	1,0000	0,9170
p-value	0,0002	0,0012	0,0002	n.c.	0,0002	0,0000

n.c. = non calcolato.

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

Due dei cinque laboratori partecipanti hanno effettuato l’identificazione della specie ospite, prova di carattere informativo e non sottoposta a valutazione di performance. Solo uno ha identificato correttamente tutti i campioni del pannello. I risultati complessivi sono riportati nella **tabella 4**.

Tabella 4. Risultati ottenuti dai laboratori partecipanti al CI AQUA RV-D 1-21: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite

Identificativo campione	Specie Ospite	L000545	L000635
C1	<i>Felis catus</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Felis catus</i>
C2	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>
C3	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>
C4	Martes spp.	Martes spp.	Martes spp.
C5	<i>Felis catus</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Felis catus</i>
C6	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>
C7	Martes spp.	Martes spp.	Martes spp.
C8	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>
C9	<i>Felis catus</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Canis lupus</i>
C10	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>
C11	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>
C12	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>
C13	Martes spp.	Martes spp.	Martes spp.

6. Discussione e raccomandazioni

Nell'ambito del CI AQUA-RV-D 1-21, 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 OIE come metodica alternativa ai metodi *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 - Rilevazione di RNA di *Lyssavirus* mediante Real Time RT-PCR (rRT-PCR)) e successive modifiche.

È stata concessa a tutti i partecipanti una proroga di una settimana per l'invio dei risultati, al termine della quale, ad eccezione di un laboratorio, tutti hanno inserito i propri risultati in AQUAWEB. Il laboratorio che non ha inserito le risposte ha avvisato l'organizzatore dopo la ricezione del pannello dell'impossibilità ad eseguire le prove, a causa della non disponibilità delle tecniche specifiche richieste.

Nonostante il calendario delle prove ed i protocolli siano stati resi disponibili con largo anticipo, si attesta una scarsa partecipazione dei laboratori afferenti alla rete degli II.ZZ.SS. e deputati alla diagnosi di rabbia di prima istanza.

I risultati del CI AQUA-RV-D 1-21 attestano nel complesso ottima competenza dei laboratori partecipanti con un'accuratezza complessiva del 98.08% e con una K= 0,92.

Il laboratorio L000545 ha ottenuto una ottima concordanza dei risultati attesi, pur identificando erroneamente 1 campione negativo (falso positivo – FP). In seguito a follow-up con il laboratorio partecipante, le cause di erronea identificazione potrebbero essere molteplici come di seguito elencate:

- Cross-contaminazione con campioni positivi in fase di estrazione dell'RNA o dell'amplificazione;
- Non corretto diagramma di flusso nella scelta dei due protocolli diagnostici in uso presso il laboratorio;
- Non corretta interpretazione dei risultati.

Solo due laboratori hanno partecipato al CI anche 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

IZSV – Centro di Referenza Nazionale per la rabbia
Report definitivo del 30/07/2021

errori. Si attesta nel complesso un ottimo risultato dei due laboratori partecipanti, seppure con un'incorretta identificazione di un campione da parte del laboratorio L000635. In seguito a follow-up con il laboratorio si evince come più probabile causa di errore, la non corretta identificazione di uno o più campioni in una delle fasi di processo analitico. I risultati relativi all'identificazione genetica della specie ospite non sono stati analizzati statisticamente.

Si sottolinea inoltre che l'organizzatore rimane a disposizione dei partecipanti, al fine di identificare eventuali criticità analitiche e mettere in atto eventuali misure correttive e/o migliorative.

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@izsvenezie.it. In 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 30/07/2021



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

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