



Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati

Circuito interlaboratorio per la diagnosi della rabbia
Report definitivo schema AQUA RV-D
1-22
Anno erogazione 2022

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 1-22</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 partecipanti allo schema AQUA RV-D 1-22: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari</i>	7
<i>Tabella 3. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito dello schema RV-D 1-22: 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 partecipanti allo schema AQUA RV-D 1-22: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite</i>	8
6. Discussione e raccomandazioni	8
7. Informativa sulla privacy	9



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 AQUA RV-D 1-22 "Identificazione del virus della rabbia/identificazione della specie ospite di infezione", oggetto del presente report, prevedeva l'identificazione del virus della rabbia e l'identificazione della specie mammifero ospite di infezione tramite l'utilizzo di metodiche biomolecolari.

Allo schema RV-D 1-22 hanno partecipato 5 laboratori appartenenti alla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (I.ZZ.SS.).

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 1-22 sono stati inviati 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, i campioni prova 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 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.

Nell'ambito del circuito 2022 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. È stato richiesto di esprimere la specie identificata avvalendosi del nome scientifico: 1-genere 2-specie da esprimere con testo (es. 1-Canis 2-lupus, 1-Felis 2-catus) e il numero della sequenza più simile a quella prodotta tra quelle disponibili in banca dati (numero di accesso GenBank). A tale scopo, ogni campione costituente il pannello, positivo o negativo per lyssavirus, era composto da encefalo di una specie di mammifero.

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

Tabella 1: Composizione del pannello dello schema AQUA RV-D 1-22.

Virus	Lineaggio	Origine	Specie ospite
West Caucasian Bat Virus	n.a.	Italia 2020	<i>Canis lupus</i>
European Bat Lyssavirus	1b	Francia 1989	<i>Vulpes vulpes</i>
European Bat Lyssavirus	2	UK 2002	<i>Capra hircus</i>
Duvenhage Virus	n.a.	Sud Africa 2012	<i>Felis catus</i>
n.a.	n.a.	n.a.	<i>Equus caballus</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. 02
- Identificazione delle specie di mammifero mediante PCR e sequenziamento Sanger del citocromo ossidasi (COI)
PDP DIA 175 rev. 01

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.

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 fare 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 - 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 14/03/2022 al 13/04/2022.

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 identificazione virale/test di immunofluorescenza diretta/isolamento virale in colture cellulari/metodiche biomolecolari/identificazione di specie del circuito interlaboratorio AQUA RV-D, 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 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 19/04/2022, contenente esclusivamente l'esito atteso.

5.2 Risultati ottenuti mediante metodica molecolare

Hanno partecipato allo schema RV-D 1-22 5 laboratori su 7 invitati. Quattro laboratori hanno identificato correttamente i campioni e un laboratorio ha ottenuto un esito non corretto su due campioni (falsi positivi) (**tabella 2**).

La statistica K calcolata per valutare le prestazioni di ciascun partecipante indica che quattro su cinque laboratori partecipanti hanno ottenuto una concordanza ottima, un laboratorio ha ottenuto una buona concordanza. Il valore di concordanza complessivo del circuito per tale metodica è risultato pari a 0.875 (valori K e p-value) (tabella 3).

Tabella 2. Risultati ottenuti dai partecipanti allo schema AQUA RV-D 1-22: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.

Identificativo campione	ATTESO	1	2	3	4	5
C1	P	P	P	P	P	P
C2	N	N	N	N	N	N
C3	P	P	P	P	P	P
C4	N	N	N	N	N	N
C5	P	P	P	P	P	P
C6	N	N	N	N	P	N
C7	P	P	P	P	P	P
C8	P	P	P	P	P	P
C9	N	N	N	N	N	N
C10	P	P	P	P	P	P
C11	P	P	P	P	P	P
C12	N	N	N	N	P	N
C13	N	N	N	N	N	N

Legenda: risultato errato

Tabella 3. Valori di K e significatività (p-value) ottenuti nell'ambito dello schema RV-D 1-22: identificazione dell'RNA virale mediante metodi molecolari.

Statistiche	1	2	3	4	5	Complessivo
Kappa	1,0000	1,0000	1,0000	0,6829	1,0000	0,875
p-value	0,0002	0,0002	0,0002	0,0047	0,0002	0,000

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

Nello schema RV-D 1-22, tutti i laboratori partecipanti hanno effettuato l'identificazione della specie ospite espressa mediante nome scientifico. Un laboratorio ha espresso inoltre anche la percentuale di identità verificata mediante sistema BOLD. Nessuno dei laboratori ha indicato il numero della sequenza più simile a quella prodotta tra quelle disponibili in banca dati (numero di accesso GenBank).

Quattro laboratori hanno identificato correttamente tutti i campioni del pannello e un laboratorio ha identificato correttamente 10 campioni su 13. I risultati complessivi sono riportati nella **tabella 4**. Si sottolinea tuttavia come i campioni derivati da gatto (C8) e capra (C6 e C11) hanno messo in evidenza alcune difficoltà interpretative, a causa dell'identità delle sequenze relative al gene COI con più di una specie animale. In questi casi, sarebbe pertanto opportuno indicare tutte le specie che riportano identità maggiore del 99%, oppure fornire l'indicazione di genere riportando tra parentesi la/le specie con maggiore identità.

Tabella 4. Risultati ottenuti dai partecipanti allo schema AQUA RV-D 1-22: metodica RT-PCR e sequenziamento per identificazione della specie ospite

Codice	Specie Ospite	1	2	3	4	5
C1	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i> 100%	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	-
C2	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus Ferus Caballus</i> 99.85%	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>
C3	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i> 99.85%	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>
C4	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus Ferus Caballus</i> 99.85%	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>
C5	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Canis lupus</i> 99.85%	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Canis lupus</i>	-
C6	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus Ferus Caballus</i> 99.85%	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>
C7	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i> 100%	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra aegagrus</i>
C8	<i>Felis silvestris/catus</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Felis Lybica</i> 99.85%	<i>Felis silvestris/catus</i>	<i>Felis silvestris</i>	<i>Felis silvestris</i>
C9	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus Ferus Caballus</i> 99.85%	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>
C10	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i> 99.85%	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>
C11	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i> 100%	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Capra hircus</i>
C12	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus Ferus Caballus</i> 99.85%	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>
C13	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus Ferus Caballus</i> 99.85%	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus caballus</i>

Legenda: specie non individuata

6. Discussione e raccomandazioni

Nell'ambito dello schema AQUA-RV-D 1-22, 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.

Per lo schema AQUA-RV-D 1-22, 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 1-22 attestano nel complesso ottima competenza dei cinque laboratori partecipanti con un'accuratezza complessiva del 96.92% e con una $K = 0,875$.

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.

Tutti i laboratori hanno partecipato allo schema 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 chiroterti, ordine di mammiferi rappresentato in Italia con 34 specie, per le quali l'identificazione morfologica è difficile e prona ad errori.

IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per la rabbia
Report definitivo emesso il 13/07/2022

Il Centro di Referenza Nazionale per la rabbia 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.

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 13/07/2022

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



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