



Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati



Circuito di virologia organismi acquatici

Report definitivo schemi AQUA IV 1-22 e IV 2-22 anno

Anno erogazione 2022

Responsabile Circuito interlaboratorio AQUA Virologia degli organismi acquatici (AQUA IV)
Dr.ssa Anna Toffan *Tel. 049/8084333*
e-mail atoffan@izsvenezie.it

Responsabile tecnico
Dott.ssa Alessandra Buratin *Tel. 049/8084388*
e-mail aburatin@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 le malattie dei pesci
V.le dell'Università 10 – 35020 LEGNARO (PD)
www.izsvenezie.it

SOMMARIO

Introduzione	4
Istituti Partecipanti	4
SCHEMA AQUA IV 1-22: Isolamento e identificazione degli agenti virali dei pesci	5
1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni.....	5
1.1. Composizione dei campioni prova.....	5
1.2. Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova.....	6
1.3. Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova	6
2. Invio e risospensione dei campioni.....	11
3. Valori assegnati	11
4. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance.....	11
5. Risultati circuito.....	11
6. Commenti generali sulla sensibilità delle colture cellulari utilizzate dai partecipanti (non soggetti all'accreditamento ISO 17043)	13
6.1 Risultati della sensibilità delle colture cellulari	13
6.2. Ulteriori indicazioni sulla sensibilità delle colture cellulari dei partecipanti rispetto ad una variabilità prefissata	17
7. Conclusioni	19
SCHEMA AQUA IV 2-22: Rilevazione del DNA del virus KHV (CyHV-3).....	20
1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni.....	20
1.1 Composizione dei campioni prova	20
1.2 Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova	21
1.3 Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova	21
2. Invio e risospensione dei campioni.....	21
3. Valori assegnati	21
4. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance.....	21
5. Risultati circuito.....	22
6. Conclusioni	22
Conclusioni Generali AQUA IV 2022.....	25
Informativa sulla privacy.....	25



Report definitivo

Introduzione

Nei mesi di Ottobre/Dicembre 2022, in ottemperanza a quanto previsto dall'art. 2 del Decreto 4 ottobre 1999, del Ministero della Sanità, il Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei, ha organizzato un circuito interlaboratorio, cui hanno aderito sette partecipanti. L'obiettivo principale del circuito è volto a monitorare le capacità diagnostiche dei laboratori degli I.I.ZZ.SS. In particolare gli agenti virali da identificare inclusi nel pannello 2022 sono stati i seguenti:

1. Virus della Setticemia Emorragica Virale (VHSv)
2. Virus della Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHNv)
3. Virus della Necrosi Pancreatica Infettiva (IPNv)
4. Herpesvirus della carpa Koi (CyHV-3)

Il presente circuito interlaboratorio (CI) è formato da 2 schemi. Lo schema AQUA IV 1-22 richiede ai partecipanti l'identificazione degli agenti virali VHSv, IHNv, e IPNv. Lo schema AQUA IV 2-22 richiede ai partecipanti la rilevazione del DNA del CyHV-3, noto anche come KHV. Entrambi gli schemi sono di tipo qualitativo.

Tutti gli operatori dell'Organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA IV sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

Istituti Partecipanti

Al circuito interlaboratorio hanno partecipato i seguenti Istituti:

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
2. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
3. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise
4. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e Marche
5. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana (sede di Roma)
6. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana (sede di Pisa)
7. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Al fine di tutelare la riservatezza dei dati, i laboratori partecipanti sono resi anonimi e identificati esclusivamente tramite codice alfa-numerico generato automaticamente dalla piattaforma AQUAweb al momento dell'iscrizione al circuito.

SCHEMA AQUA IV 1-22: Isolamento e identificazione degli agenti virali dei pesci

1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni

1.1. Composizione dei campioni prova

Ad ogni laboratorio sono stati inviati 5 flaconi, contenenti 0,5 ml ciascuno di surnatante di coltura cellulare infettata con gli agenti virali descritti in tabella 1, miscelati nel rapporto 1:1 con una soluzione acquosa di idrolizzato di lactalbumina al 20% p/v e liofilizzati. La procedura per la ricostituzione del liofilo e per l'esecuzione delle prove di isolamento e titolazione virale è dettagliata nel documento "Modalità operative AQUA IV" disponibile sulla piattaforma AQUAweb.

Tabella 1: Composizione dello schema AQUA IV 1-22

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO	N° DI PASSAGGI E LINEA CELLULARE
1	IHNv 217/A Bovo G., Giorgetti G., Jorgensen PEV and Olesen N.J. (1987). Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 7(5): 124.	Lotto 1/20	12° EPC
2	Coinfezione	Lotto 1/19	37° EPC
	VHS F1 Jensen M. (1965). "Research on the virus of Egtved diseases" Ann NY A cad Sci 126:422-426	Lotto 2/19	
	IHNv/O.mykiss/I/TN/509/Oct/15 Zamperin, G., Lucas, P., et al., (2019). Sequencing of animal viruses: quality data assurance for NGS bioinformatics. Virology Journal 16, 140.	Lotto 1/19	
3	IPNv Jorgensen P.E.V. and Grauballe P.C. (1971) Acta Veterinaria Scandinavica. 12, 145 Jorgensen, P.E.V. (1974) A study of viral disease in danish rainbow trout. Their diagnosis and control". Thesis/dissertation.	Lotto 1/20	21° BF-2
4	VHS F1 Jensen M. (1965). "Research on the virus of Egtved diseases" Ann NY A cad Sci 126:422-426	Lotto 1/08	34° BF-2
5	VHS F1 Jensen M. (1965). "Research on the virus of Egtved diseases" Ann NY A cad Sci 126:422-426	Lotto 1/20	38° EPC

La sterilità del materiale liofilizzato è stata confermata controllando un flacone di ogni lotto prodotto ex novo e liofilizzato, mediante semina su TSB addizionato di estratto di lievito e successiva incubazione per 7 giorni a 37°C. Contemporaneamente è stato allestito anche un campione su terreno sabouraud, incubato a 25°C per 7 giorni. Le prove di sterilità hanno dato esito conforme.

1.2. Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova

La verifica della omogeneità dei campioni prova è stata effettuata mediante:

- PDP ITT 008 Esame virologico per la sorveglianza e la conferma di infezioni da Necrosi ematopoietica infettiva e Setticemia emorragica virale mediante isolamento in colture cellulari (Reg Del UE 2020/689 17/12/2019 GU UE L174 03/06/2020 + DTU EU-RL AQUA Fish VHS-IHN Vers 2 2021)
- PDP ITT 009 Identificazione del Virus della Setticemia Emorragica Virale e della Necrosi Ematopoietica Infettiva in specie ittiche mediante immunofluorescenza (Reg Del UE 2020/689 17/12/2019 GU UE L174 03/06/2020 + DTU EU-RL AQUA Fish VHS-IHN Vers 2 2021)
- PDP ITT 024 Identificazione del virus della Necrosi pancreatica infettiva mediante immunofluorescenza

La titolazione viene effettuata su 5 flaconi. L'organizzatore del circuito ritiene idonea la titolazione di ogni virus quando la titolazione media osservata rientra nel range compreso tra 10^2 - 10^8 TCID₅₀/25 µl e la variazione massima tra le osservazioni è inferiore a un logaritmo. Poiché il titolo dei flaconi è risultato omogeneo il lotto liofilizzato di campioni prova è stato considerato omogeneo.

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

1.3. Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova

L'identificazione del virus oggetto di valutazione nel CI, controllata in fase di verifica dell'omogeneità, non è soggetta a cambiamenti nel tempo ed è quindi da ritenersi stabile, come tale, nel periodo di esecuzione del circuito.

Ci può essere però una riduzione della vitalità del virus contenuto nei campioni prova con il passare del tempo. Per escludere quindi una perdita del titolo virale fino alla degradazione totale, la titolazione su piastra descritta in precedenza viene ripetuta su entrambe le linee cellulari, prima dell'invio dei campioni prova ai laboratori aderenti al circuito e alla fine del periodo di analisi del circuito, su 5 campioni selezionati random, per ogni virus oggetto del test. Il titolo finale viene determinato con l'utilizzo della formula di Reed- Muench.

Il metodo di titolazione virale su coltura cellulare, per le sue caratteristiche intrinseche, risente di una certa variabilità (± 1 log) che risulta pertanto attesa e tollerata.

Tenendo conto di ciò, l'organizzatore del circuito ritiene che non ci sia una variazione importante se:

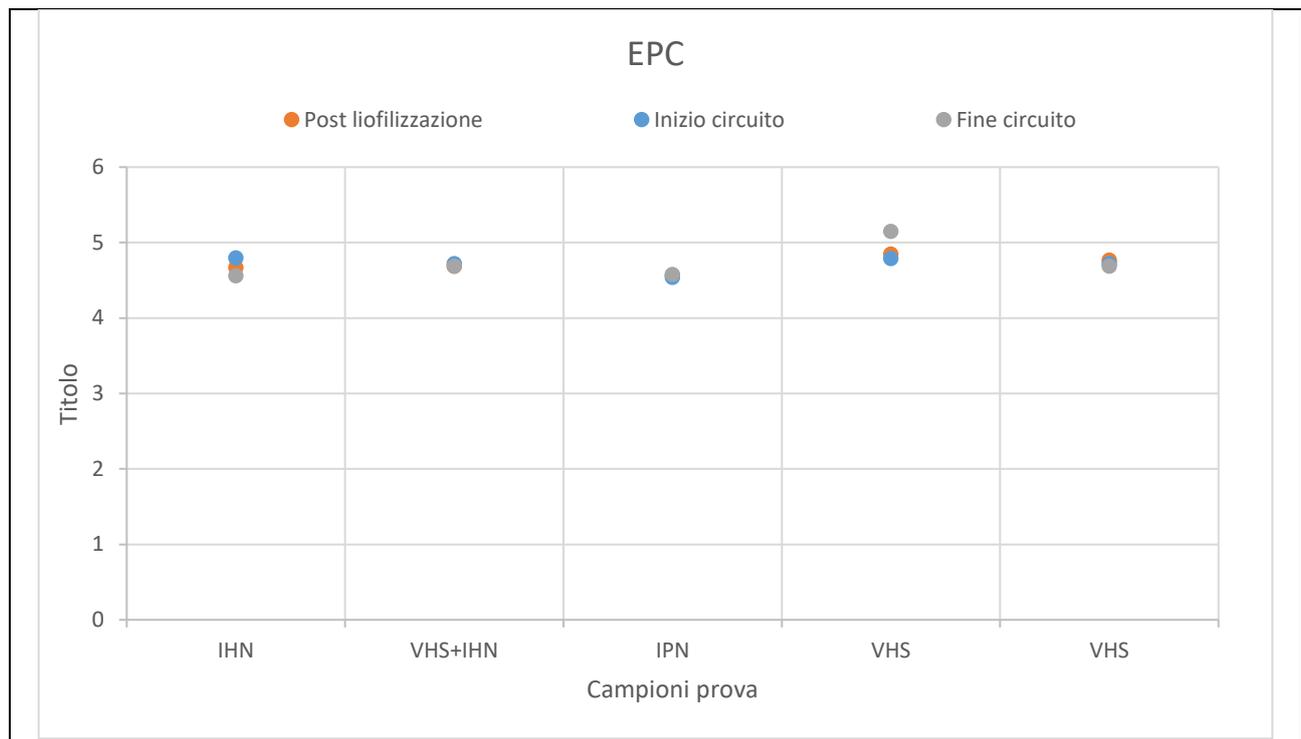
$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| < 1 \log$$

lo scostamento delle medie delle titolazioni effettuate prima dell'inizio e dopo la fine del periodo di esecuzione del circuito è inferiore a 1 logaritmo ($\delta = 1 \log = 0,3\sigma_{pt} \rightarrow \sigma_{pt} = 0,33$).

In Figura 1 e in Tabella 2 si riporta la statistica descrittiva dei valori delle titolazioni per virus e linea cellulare nei tre momenti di analisi: post liofilizzazione, all'inizio e alla fine del circuito.

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

Figura 1: Andamento medio del titolo virale dei flaconi liofilizzati (n° 3 flaconi per istante temporale) nelle due linee cellulari utilizzate



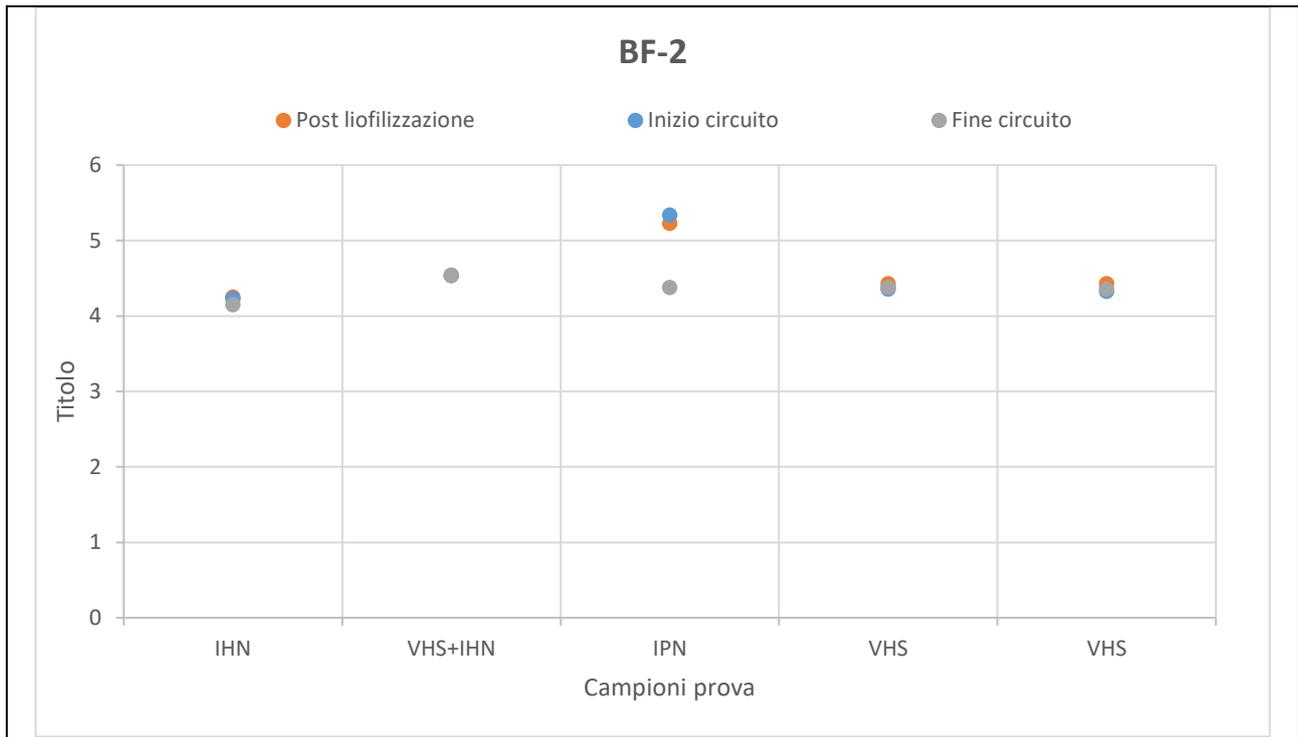


Tabella 2: statistica descrittiva dei valori delle titolazioni per virus e linea cellulare

EPC

Momento di osservazione	data	Statistica	1-IHN	2-VHS+IHN	3-IPN	4-VHS	5-VHS
POST LIOFILIZZAZIONE	04/08/2022	Media 5 osservazioni	4,67	4,69	4,57	4,85	4,77
		Deviazione standard	0,21	0,08	0,11	0,29	0,14
		Incertezza	0,09	0,04	0,05	0,13	0,06

INIZIO CIRCUITO	03/10/2022	Media 5 osservazioni	4,80	4,72	4,54	4,79	4,72
		Deviazione standard	0,21	0,07	0,05	0,27	0,07
		Incertezza	0,09	0,03	0,02	0,12	0,03

FINE CIRCUITO	20/12/2022	Media 5 osservazioni	4,56	4,69	4,58	5,15	4,69
		Deviazione standard	0,05	0,08	0,04	0,14	0,08
		Incertezza	0,02	0,04	0,02	0,06	0,04

BF-2

Momento di osservazione	data	Statistica	1-IHN	2-VHS+IHN	3-IPN	4-VHS	5-VHS
POST LIOFILIZZAZIONE	04/08/2022	Media 5 osservazioni	4,25	4,54	5,23	4,43	4,43
		Deviazione standard	0,16	0,05	0,14	0,11	0,11
		Incertezza	0,07	0,02	0,06	0,05	0,05

INIZIO CIRCUITO	03/10/2022	Media 5 osservazioni	4,23	4,54	5,34	4,36	4,33
		Deviazione standard	0,14	0,05	0,08	0,11	0,12

		Incertezza	0,06	0,02	0,04	0,05	0,05
--	--	-------------------	------	------	------	------	------

FINE CIRCUITO	20/12/2022	Media 5 osservazioni	4,15	4,54	4,38	4,38	4,36
		Deviazione standard	0,14	0,05	0,13	0,13	0,05
		Incertezza	0,06	0,02	0,06	0,06	0,05

Per la verifica della stabilità della titolazione virale, in Tabella 3 viene riportata la differenza, in termini assoluti, tra titolo virale osservato all'inizio e alla fine del periodo di esecuzione del circuito interlaboratorio.

Tabella 3: Scostamento assoluto delle medie delle titolazioni $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ effettuate prima dell'inizio e dopo la fine del periodo di esecuzione del circuito per ogni virus e linea cellulare

	1-IHN	2-VHS+IHN	3-IPN	4-VHS	5-VHS
EPC	0,24	0,03	0,04	0,36	0,03
BF-2	0,08	0,00	0,96	0,02	0,03

Lo scostamento delle medie delle titolazioni è inferiore a 1 logaritmo e quindi la titolazione dei virus è da ritenersi stabile nel periodo di esecuzione del circuito, per tutti i virus oggetto del test e su entrambe le linee cellulari.

2. Invio e risospensione dei campioni

I flaconi sono stati inviati ad ogni laboratorio partecipante. La procedura dettagliata contenente le modalità operative da seguire per l'identificazione e la titolazione su cellule è disponibile su AQUAWeb.

Periodo per l'esecuzione delle prove: dal 17/10/2022 al 23/12/2022.

3. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale del circuito AQUA IV 1-22, 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.

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

In accordo a quanto indicato nella ISO 13528, in presenza di un circuito interlaboratorio qualitativo, la valutazione della performance viene effettuata attribuendo dei punteggi alle risposte dei partecipanti in relazione al valore assegnato.

Il metodo di valutazione del circuito in esame prevede che siano assegnati 2 punti per ogni campione prova il cui contenuto è stato correttamente identificato. Viene dato 1 punto nel caso di mancata o non corretta identificazione di uno dei virus presenti nelle eventuali infezioni miste, mentre, nel caso di mancata o di non corretta identificazione di tutti i virus presenti nei campioni prova con infezioni miste o del virus presente in singolo vengono dati 0 punti.

La prestazione del laboratorio è ritenuta accettabile dal Responsabile del circuito AQUA IV se la somma dei punteggi è superiore/uguale a 8 punti su 10.

5. Risultati circuito

6 laboratori su 7 partecipanti al circuito hanno identificato correttamente il contenuto di 5 flaconi totalizzando quindi il punteggio massimo di 10. Un laboratorio ha identificato in modo scorretto un virus (-1 punto) e contaminato con un virus addizionale un altro flacone (-2 punti) totalizzando così 7 punti totali.

In Tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

Tabella 4: Risultati e punteggio complessivo dei diversi laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio AQUA IV 1-22

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	Valore assegnato per flacone	ELISA	Identificazione in ELISA	IF	Identificazione in IF	RT-PCR	Identificazione in RT-PCR	Altro	Identificazione in altro metodo	Punteggio ottenuto
L000394	18/10/2022	29/11/2022	Flacone 1: IHN	NE		NE		P	IHN			10
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		NE		P	VHS - IHN			
			Flacone 3: IPN	NE		NE		P	IPN			
			Flacone 4: VHS	NE		NE		P	VHS			
			Flacone 5: VHS	NE		NE		P	VHS			
L000410	18/10/2022	25/11/2022	Flacone 1: IHN	NE		P	IHN	NE				10
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		P	VHS - IHN	NE				
			Flacone 3: IPN	NE		P	IPN	NE				
			Flacone 4: VHS	NE		P	VHS	NE				
			Flacone 5: VHS	NE		P	VHS	NE				
L000417	18/10/2022	20/10/2022	Flacone 1: IHN	NE		NE		P	IHN			10
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		NE		P	VHS - IHN			
			Flacone 3: IPN	NE		NE		P	IPN			
			Flacone 4: VHS	NE		NE		P	VHS			
			Flacone 5: VHS	NE		NE		P	VHS			
L000438	18/10/2022	25/10/2022	Flacone 1: IHN	NE		P	IHN	P	IHN			10
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		P	IHN - VHS	P	VHS - IHN			
			Flacone 3: IPN	NE		P	IPN	N				
			Flacone 4: VHS	NE		P	VHS	P	VHS			
			Flacone 5: VHS	NE		P	VHS	P	VHS			
L000456	18/10/2022	27/10/2022	Flacone 1: IHN	NE		P	IHN	P	IHN			10
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		P	IHN - VHS	P	VHS - IHN			
			Flacone 3: IPN	NE		P	IPN	P	IPN			
			Flacone 4: VHS	NE		P	VHS	P	VHS			
			Flacone 5: VHS	NE		P	VHS	P	VHS			
L000549	28/10/2022	24/11/2022	Flacone 1: IHN	NE		P	IHN	NE				7
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		P	SVC - IHN	NE				
			Flacone 3: IPN	NE		P	IPN	NE				
			Flacone 4: VHS	NE		P	VHS	NE				
			Flacone 5: VHS	NE		P	IPN - VHS	NE				
L000682	19/10/2022	09/11/2022	Flacone 1: IHN	NE		P	IHN	P	IHN			10
			Flacone 2: VHS-IHN	NE		P	VHS - IHN	P	VHS - IHN			
			Flacone 3: IPN	NE		P	IPN	P	IPN			
			Flacone 4: VHS	NE		P	VHS	P	VHS			
			Flacone 5: VHS	NE		P	VHS	P	VHS			

Legenda: P=Positivo, N=Negativo, NE= Non eseguito. I risultati errati vengono segnati in rosso.

IZSve – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci
Report definitivo emesso il 06/03/2023

6. Commenti generali sulla sensibilità delle colture cellulari utilizzate dai partecipanti (non soggetti all'accreditamento ISO 17043)

In analogia con il centro di riferimento comunitario, il Responsabile del circuito interlaboratorio AQUA IV ritiene utile dare indicazioni sullo stato delle linee cellulari utilizzate dai laboratori partecipanti.

6.1 Risultati della sensibilità delle colture cellulari

Ai partecipanti sono state richieste informazioni relative alle cellule impiegate in ciascun laboratorio. Di seguito vengono fornite delle statistiche di sintesi e un'analisi grafica dei titoli virali ottenuti (espressi come valore dell'esponente), per virus e linea cellulare.

Tabella 5: Principali informazioni relative alle cellule utilizzate dai partecipanti allo schema

Laboratorio	Linea cellulare	Origine	N° passaggio	Terreno colturale	Supplementi	Supplementi altro	Note
L000394	EPC	IZS Venezie	294	EMEM-Sigma	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,		Colture cellulari fornite dal Centro di Referenza e conservate in azoto; passate 24 ore prima dell'inoculo
	BF-2	IZS Venezie	153	EMEM-Sigma	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,		
L000410	EPC	IZSVE-EURL for fish diseases (DVL) Danimarca	213.13.10.28	MEM	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 5% Antibiotici, 1% Antibiotici,		fine prove 16/12/2022
	BF-2	IZSVE-EURL for fish diseases (DVL) Danimarca	384.40.45	MEM	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici,		
L000438	EPC	PD	229.13.10.7.2	MEM GIBCO	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,		Nessuna
	BF-2	PD	384.40.8.2	MEM GIBCO	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,		
L000456	EPC	IZSVE	67	MEM	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA,		
	BF-2	IZSLER	139	MEM	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA,		
L000549	EPC	IZSVe	229.13.10.49.1 1	MEM Sigma	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici,	1% HEPES	/
	BF-2	IZSVe	384.40.211.26	MEM Sigma	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici,	1% HEPES	
L000682	EPC	IZSVE	425	MEM	10% SFB, 5% Antibiotici, 1% Antibiotici,		N.A.
	BF-2	IZSVE	430	MEM	10% SFB, 5% Antibiotici,		

Tabella 6: Titolo virale (espresso come valore dell'esponente) ottenuto dai partecipanti nei diversi flaconi su linea cellulare EPC e BF-2 secondo il metodo di Reed e Muench ed espresso in TCID₅₀/25µl.

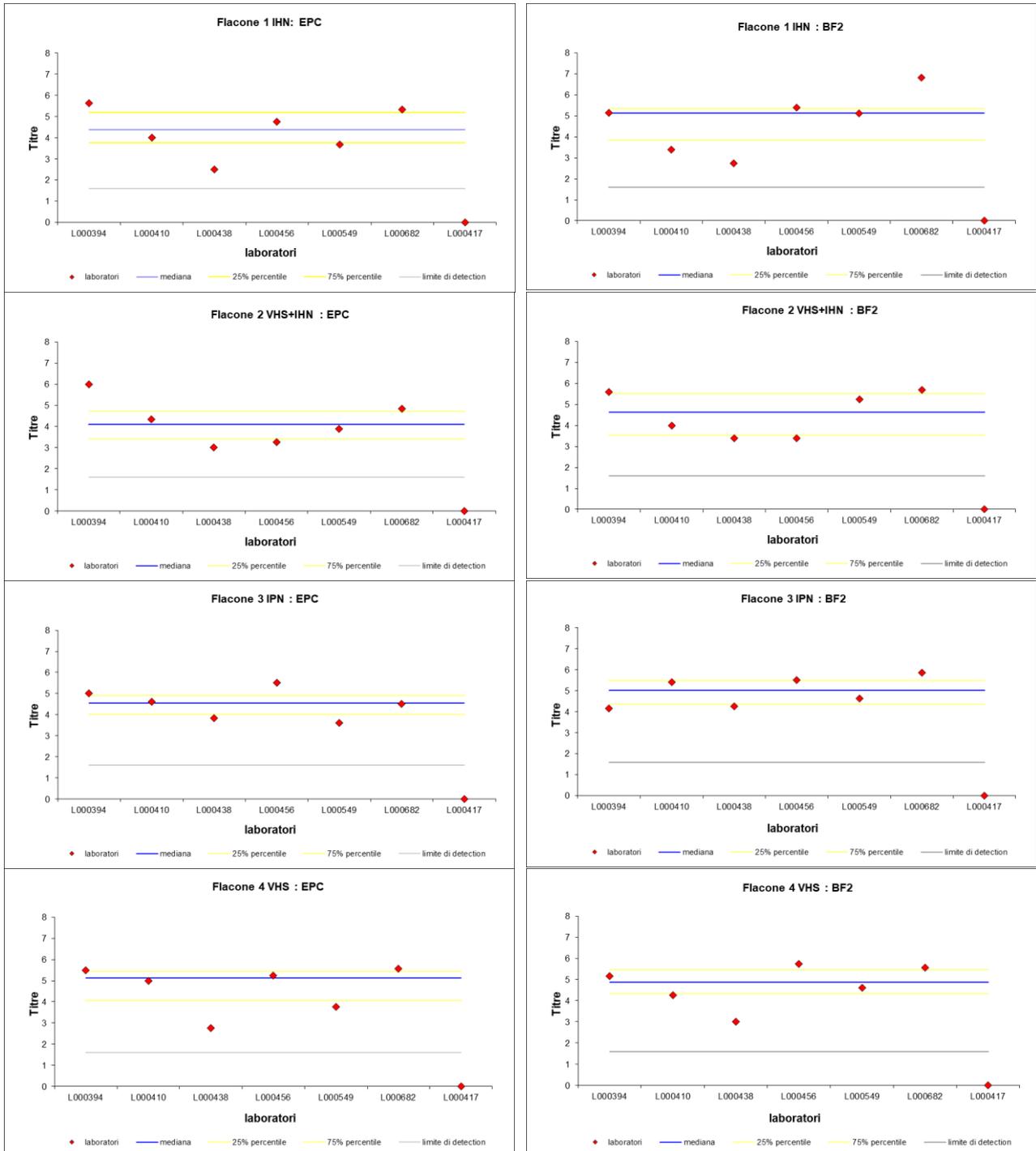
	Cod Partecipante	IHN	VHS+IHN	IPN	VHS	VHS
EPC	L000394	5,64	6,00	5,00	5,50	5,25
	L000410	4,00	4,34	4,60	5,00	4,25
	L000438	2,50	3,00	3,84	2,75	3,25
	L000456	4,75	3,25	5,50	5,25	4,75
	L000549	3,69	3,88	3,60	3,75	3,25
	L000682	5,33	4,85	4,50	5,55	4,67
	L000417	-	-	-	-	-
BF	L000394	5,16	5,60	4,16	5,16	5,00
	L000410	3,40	4,00	5,40	4,25	4,00
	L000438	2,75	3,40	4,25	3,00	3,00
	L000456	5,40	3,40	5,50	5,75	4,75
	L000549	5,13	5,25	4,64	4,60	4,69
	L000682	6,82	5,70	5,85	5,55	5,00
	L000417	-	-	-	-	-

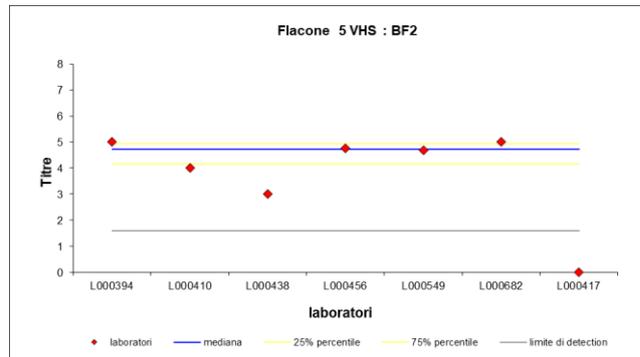
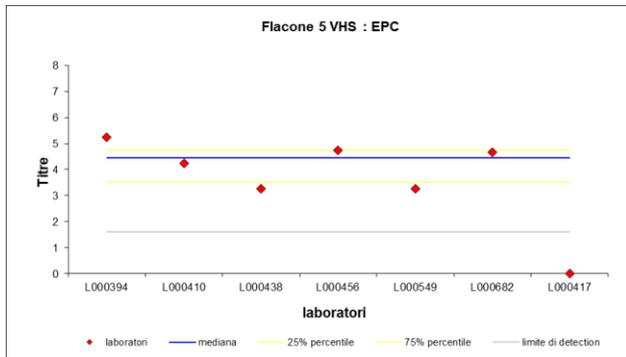
Tabella 7: Statistiche di sintesi dei titoli virali ottenuti dai diversi partecipanti allo schema (espressi come valore dell'esponente) per virus e linea cellulare

EPC	Flacone 1 IHN	Flacone 2 VHS+IHN	Flacone 3 IPN	Flacone 4 VHS	Flacone 5 VHS
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	4,38	4,11	4,55	5,13	4,46
Titolo massimo	5,64	6,00	5,50	5,55	5,25
Titolo minimo	2,50	3,00	3,60	2,75	3,25
25% quartile	3,77	3,41	4,01	4,06	3,50
75% quartile	5,19	4,72	4,90	5,44	4,73

BF2	Flacone 1 IHN	Flacone 2 VHS+IHN	Flacone 3 IPN	Flacone 4 VHS	Flacone 5 VHS
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	5,14	4,63	5,02	4,88	4,72
Titolo massimo	6,82	5,70	5,85	5,75	5,00
Titolo minimo	2,75	3,40	4,16	3,00	3,00
25% quartile	3,83	3,55	4,35	4,34	4,17
75% quartile	5,34	5,51	5,48	5,45	4,94

Figura 2: Sensibilità cellulare dei singoli laboratori in EPC e BF-2





6.2. Ulteriori indicazioni sulla sensibilità delle colture cellulari dei partecipanti rispetto ad una variabilità prefissata

Per dare una indicazione oggettiva della sensibilità delle linee cellulari utilizzate dai laboratori partecipanti, per ogni campione prova inviato e per ogni partecipante viene calcolato l'Information score (I-score) dato da:

$$I - score = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{\sigma_{pt}^2}}$$

Dove

x = titolo virale trasmesso dal partecipante relativo al campione i -esimo;

\bar{x} = media dei dati di titolazione virale osservati all'inizio e alla fine del circuito dall'organizzatore del circuito, relativi al lotto di produzione dell' i -esimo campione;

σ_{pt} = deviazione standard target definita dall'organizzatore.

Se l'incertezza della media dei dati di titolazione virale osservati all'inizio e alla fine del circuito $u(\bar{x})$ non è trascurabile rispetto alla deviazione standard target ($u(\bar{x}) > 0,3\sigma_{pt}$), l'Information score viene aggiustato nel seguente modo:

$$I' - score = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{\sigma_{pt}^2 + u(\bar{x})^2}}$$

L'interpretazione dell'I-score o I'-score è la seguente:

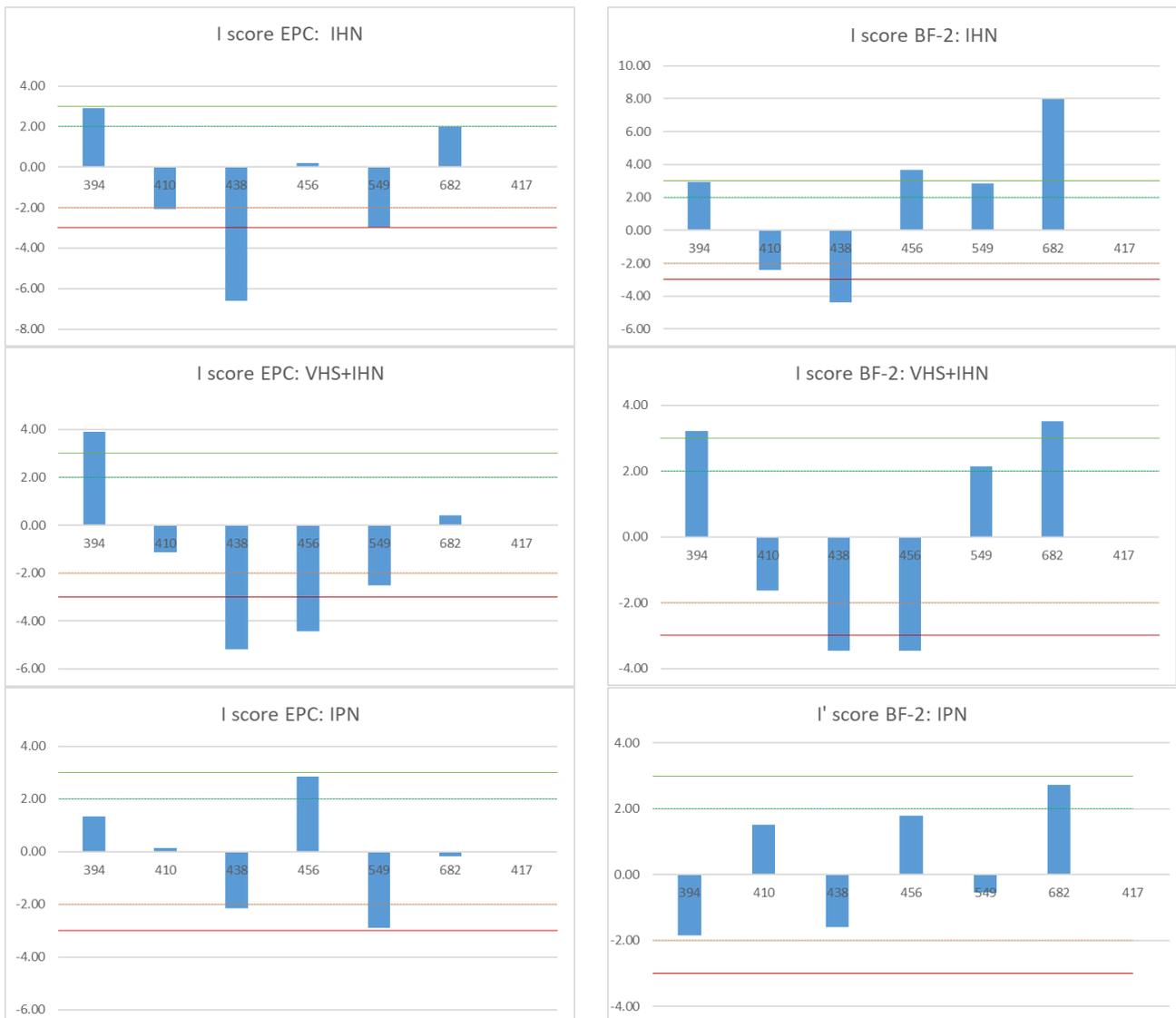
I-score < -3	Titolazione molto sottostimata rispetto alla media
-3 ≤ I-score < -2	Titolazione sottostimata rispetto alla media
-2 ≤ I-score < 2	Titolazione in media
2 ≤ I-score < 3	Titolazione sovrastimata rispetto alla media
I-score ≥ 3	Titolazione molto sovrastimata rispetto alla media

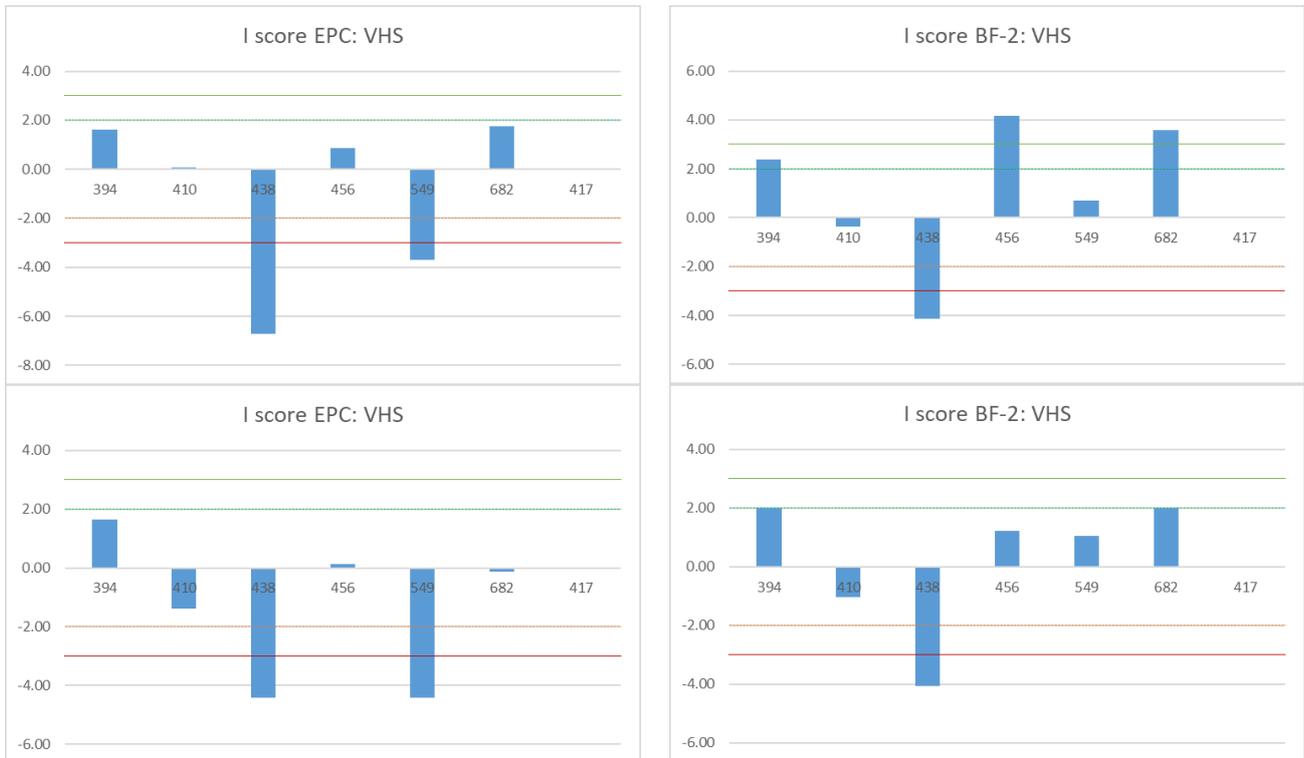
L'information score, ottenuto dal confronto del titolo virale di ogni partecipante con il titolo medio ottenuto dall'organizzatore del circuito in fase di verifica dell'idoneità dei campioni prova, rapportato ad una variabilità definita "accettabile" dall'organizzatore del circuito stesso, fornisce una indicazione oggettiva della sensibilità delle colture cellulari utilizzate dei partecipanti, indipendente dall'esito del circuito stesso e monitorabile nel tempo.

Una elevata sottostima del titolo virale rispetto a quanto osservato dal Responsabile del circuito interlaboratorio, suggerisce al partecipante l'ipotesi di prendere in considerazione la sostituzione delle cellule impiegate con altri cloni di adeguata sensibilità.

L'incertezza è risultata trascurabile per tutti i virus considerati ad esclusione del virus IPN nel campione prova 3 per il quale si fornisce quindi l'I' score in Figura 3. Per i restanti virus i grafici in figura 3 riportano l'I score.

Figura 3: Information score (I) e Information' score (I') dei laboratori partecipanti al CI AQUA IV 1-22





La sovrastima del titolo virale può essere dovuta a diversi fattori (manualità dell'operatore, interpretazione dell'effetti citopatico, ecc.), e sebbene debba essere monitorata nel tempo, non è in genere un dato da considerare negativamente, in quanto non inficia la capacità diagnostica del laboratorio. Al contrario, la sottostima del titolo virale è generalmente legata alla sensibilità delle linee cellulari in uso e può influire negativamente sulla capacità diagnostica del laboratorio.

Il laboratorio L000438 riporta titoli da molto sottostimati a sottostimati per i flaconi 1-2-4-5 per entrambe le linee cellulari.

Il laboratorio L000549 riporta titoli da molto sottostimati a sottostimati per i flaconi 1-2-3-4-5- per la linea cellulare EPC.

Il laboratorio L000456 riporta titoli molto sottostimati per il flacone 2 per entrambe le linee cellulari.

7. Conclusioni

6 laboratori su 7 hanno identificato correttamente i virus contenuti nei campioni prova.

Solo il laboratorio L000549 non ha correttamente identificato una delle due specie virali presenti nel Flacone 2 e ha erroneamente identificato una specie virale aggiuntiva nel Flacone 5, imputabile quindi a cross contaminazione dei campioni. Tale laboratorio ha quindi totalizzato 7 punti su 10, riportando quindi un giudizio non accettabile. Poiché questo laboratorio presenta inoltre titoli sottostimati in tutti i campioni con la linea cellulare EPC, si raccomanda al laboratorio L000549 di monitorare attentamente le linee cellulari in uso e di ripetere il circuito interlaboratorio al fine di identificare i motivi alla base del risultato negativo ottenuto.

SCHEMA AQUA IV 2-22: Rilevazione del DNA del virus KHV (CyHV-3)

1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni

1.1 Composizione dei campioni prova

Ad ogni laboratorio sono stati inviati 5 flaconi contenenti 0,5 ml ciascuno di surnatante di coltura cellulare CCB infettata con il CyHV-3 anche noto come koi herpesvirus (KHV), opportunamente diluito per generare campioni a diversa positività e miscelato nel rapporto 1:1 con una soluzione acquosa di idrolizzato di lactalbumina al 20% p/v e liofilizzato. La procedura per la ricostituzione del liofilo e per l'esecuzione delle prove di biologia molecolare è descritta nel documento "Modalità operative AQUA IV" disponibile sulla piattaforma AQUAweb.

Tabella 1: Composizione dello schema AQUA IV 2-22

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO
1	MEM 50% MEM Sigma lotto RNBG4909 + 50% Lattoalbumina al 20%	Lotto 1/18
2	MEM 50% MEM Sigma lotto RNBG4909 + 50% Lattoalbumina al 20%	Lotto 1/18
3	KHV 07/108b Cabon, Louboutin, Castric, Bergmann, Bovo, Matras, Haenen, Olesen, Morin. Validation of a serum neutralization test for detection of antibodies specific to cyprinid herpesvirus 3 in infected common and koi carp (<i>Cyprinus carpio</i>). J Fish Dis. 2017 May;40(5):687-701. doi: 10.1111/jfd.12550. Epub 2016 Sep 22	Lotto 5/18
4	KHV 07/108b Cabon, Louboutin, Castric, Bergmann, Bovo, Matras, Haenen, Olesen, Morin. Validation of a serum neutralization test for detection of antibodies specific to cyprinid herpesvirus 3 in infected common and koi carp (<i>Cyprinus carpio</i>). J Fish Dis. 2017 May;40(5):687-701. doi: 10.1111/jfd.12550. Epub 2016 Sep 22	Lotto 1/21
5	KHV 07/108b Cabon, Louboutin, Castric, Bergmann, Bovo, Matras, Haenen, Olesen, Morin. Validation of a serum neutralization test for detection of antibodies specific to cyprinid herpesvirus 3 in infected common and koi carp (<i>Cyprinus carpio</i>). J Fish Dis. 2017 May;40(5):687-701. doi: 10.1111/jfd.12550. Epub 2016 Sep 22	Lotto 1/21

1.2 Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova

La verifica della omogeneità dei campioni prova è stata effettuata mediante:

- PDP ITT 101 Rilevazione dell'Herpes virus della Carpa Koi (KHV) mediante real time PCR

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

1.3 Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova

Poiché i campioni prova sono stati correttamente identificati il campione prova è stato considerato stabile.

2. Invio e risospensione dei campioni

Ogni laboratorio ha ricevuto 5 flaconi. La procedura contenente le modalità operative da seguire per l'identificazione e la titolazione su cellule è disponibile nella piattaforma AQUAweb.

Periodo per l'esecuzione delle prove: dal 17/10/2022 al 23/12/2022.

3. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale del circuito AQUA IV 2-22, 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.

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

In accordo a quanto indicato nella ISO 13528, in presenza di un circuito interlaboratorio qualitativo, la valutazione della performance viene effettuata attribuendo dei punteggi alle risposte dei partecipanti in relazione al valore assegnato.

Il metodo di valutazione del circuito in esame prevede che siano assegnati 2 punti per ogni campione prova il cui contenuto è stato correttamente identificato. Nel caso di mancata identificazione di un campione vengono dati 0 punti.

La prestazione del laboratorio è ritenuta accettabile dal Responsabile del circuito AQUA IV se la somma dei punteggi è superiore a 3/5 punti del massimo punteggio ottenibile.

5. Risultati circuito

6 laboratori su 6 partecipanti al circuito hanno identificato il contenuto di tutti i flaconi totalizzando quindi il punteggio 10/10.

In Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

6. Conclusioni

6 laboratori su 6 hanno identificato/non identificato i virus contenuti nei campioni prova ottenendo il massimo punteggio. Il laboratorio L000410 ha riportato valori di Ct non compatibili con il metodo dichiarato (PCR end point) né verosimili. Inoltre le date di ricevimento flaconi riportate dai laboratori appaiono incongruenti con la data di spedizione. Si ricorda pertanto ai laboratori di prestare maggior attenzione nella compilazione della documentazione richiesta.

Tabella 2: Risultati e punteggio complessivo dei laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	Metodo d'analisi	Valore assegnato per flacone	Esito	Ct (se presente)	Punteggio ottenuto
L000394	14/11/2022	21/11/2022	Real Time PCR, riferimento bibliografico O. Gilad et al Dis. Aquat Org. 2004, 60:179-187	Flacone 1-N	N		10
				Flacone 2-N	N		
				Flacone 3-P	P	33,5	
				Flacone 4- P	P	30,66	
				Flacone 5- P	P	30,41	
L000410	12/12/2022	15/12/2022	PCR END POINT - OIE KHV1 PRIMERS (Bercovier)	Flacone 1-N	N	3	10
				Flacone 2-N	N	3	
				Flacone 3-P	P	3	
				Flacone 4- P	P	3	
				Flacone 5- P	P	3	
L000417	20/10/2022	20/10/2022	Real Time RT - PCR (Procedura LNR - IZSVe PDP ITT 101)	Flacone 1-N	N		10
				Flacone 2-N	N		
				Flacone 3-P	P	36,23	
				Flacone 4- P	P	32,83	
				Flacone 5- P	P	32,25	
L000438	11/11/2022	20/12/2022	Real time RT-PCR (Gilad et al., 2004)	Flacone 1-N	N		10
				Flacone 2-N	N		
				Flacone 3-P	P	36	
				Flacone 4- P	P	30,2	
				Flacone 5- P	P	29,3	
L000549	12/12/2022	12/12/2022	Real time PCR	Flacone 1-N	N	40	10
				Flacone 2-N	N	40	
				Flacone 3-P	P	34,7	
				Flacone 4- P	P	31,3	
				Flacone 5- P	P	32,4	

*IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci
Report definitivo emesso il 06/03/2023*

L000682	19/10/2022	19/10/2022	End Point PCR - Bercovier et al., 2005	Flacone 1-N	N	10
				Flacone 2-N	N	
				Flacone 3-P	P	
				Flacone 4- P	P	
				Flacone 5- P	P	

Legenda: P=Positivo, N=Negativo. I risultati errati vengono segnati in rosso.

Conclusioni Generali AQUA IV 2022

Nel presente report sono riportati i risultati del circuito annuale interlaboratorio AQUA IV 2022 organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei pesci.

I risultati dello schema AQUA IV 2022 sono stati soddisfacenti sia per il circuito AQUA IV 1-22 (6 laboratori su 7 hanno identificato correttamente il contenuto di tutti i flaconi) che per il circuito AQUA IV 2-22 (tutti i partecipanti hanno identificato correttamente il contenuto di tutti i flaconi). L'unico laboratorio che non ha raggiunto un risultato accettabile è già stato contattato e le modalità di ripetizione sono già state concordate (invio di un secondo pannello).

I risultati qui presentati verranno discussi durante la consueta riunione di aggiornamento degli I.ZZ.SS. che verrà organizzata dal Centro di Referenza in ottobre p.v.

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 06/03/2023



Il Responsabile del Circuito Interlaboratorio AQUA IV
Dr.ssa Anna Toffan

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

IZSVE – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci
Report definitivo emesso il 06/03/2023