



Circuito interlaboratorio  
per l'assicurazione qualità  
dei risultati



Circuito di virologia organismi acquatici

## Report definitivo schemi AQUA IV 1-23 e IV 2-23

Anno erogazione 2023

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

Responsabile tecnico  
*Dott.ssa Alessandra Buratin* *Tel. 049/8084388*  
*e-mail [aburatin@izsvenezie.it](mailto:aburatin@izsvenezie.it)*

Responsabile statistico  
*Dr.ssa Mancin Marzia* *Tel.049/8084431*  
*e-mail [mmancin@izsvenezie.it](mailto:mmancin@izsvenezie.it)*

Segreteria  
*Dr.ssa Paola Mozzi* *Tel. 049 8084371-369*  
*e-mail [pmozzi@izsvenezie.it](mailto: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](http://www.izsvenezie.it)

## SOMMARIO

<b>Introduzione</b> .....	<b>4</b>
<b>Istituti Partecipanti</b> .....	<b>4</b>
<b>SCHEMA AQUA IV 1-23: Isolamento e identificazione degli agenti virali dei pesci</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni</b> .....	<b>5</b>
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
<b>2. Invio e risospensione dei campioni</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Valori assegnati</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Risultati circuito</b> .....	<b>10</b>
<b>6. Commenti generali sulla sensibilità delle colture cellulari utilizzate dai partecipanti (non soggetti all'accreditamento UNI EN ISO/IEC 17043:2010)</b> .....	<b>13</b>
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
<b>7. Conclusioni</b> .....	<b>20</b>
<b>SCHEMA AQUA IV 2-23: Rilevazione del DNA del virus KHV (CyHV-3)</b> .....	<b>21</b>
<b>1. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni</b> .....	<b>21</b>
1.1 Composizione dei campioni prova.....	21
1.2 Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova.....	22
1.3 Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova .....	22
<b>2. Invio e risospensione dei campioni</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Valori assegnati</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance</b> .....	<b>22</b>
<b>5. Risultati circuito</b> .....	<b>22</b>
<b>6. Conclusioni</b> .....	<b>23</b>
<b>Informativa sulla privacy</b> .....	<b>25</b>



## Report definitivo

### Introduzione

Nei mesi di Ottobre-Dicembre 2023, 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 n° 7 partecipanti. L'obiettivo principale del circuito è volto a monitorare le capacità diagnostiche dei laboratori degli *II.ZZ.SS.* che si occupano di virologia ittica. In particolare gli agenti virali da identificare inclusi nel pannello 2023 sono stati i seguenti:

1. Virus della Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHNV)
2. Virus della Necrosi Pancreatica Infettiva (IPNV)
3. Virus della Viremia Primaverile della Carpa (SVCv)
4. Herpesvirus della carpa Koi (CyHV-3)

Il presente circuito interlaboratorio (CI) è formato da 2 schemi:

- IV 1-23 "Isolamento ed identificazione degli agenti virali dei pesci (Virus della Setticiemia emorragica virale – VHSv, Virus della Necrosi ematopoietica infettiva – IHNV, virus della Necrosi pancreatica infettiva - IPNV, Virus della Viremia primaverile della carpa – SVCv)";
- IV 2-23 "Rilevazione del DNA del Herpesvirus della carpa Koi (CyHV-3)".

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 1-23: 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 n° 5 flaconi (in doppia aliquota), contenenti 0,5 ml ciascuno di surnatante di coltura cellulare infettata con gli agenti virali descritti in tabella 1. 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 1-23**

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO	N° DI PASSAGGI E LINEA CELLULARE
1	<b>SVCv 56/70</b> Fijan N. et al (1971). Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. Veterinary Archives 41: 125-138.	2/22	8° EPC
2	<b>NEGATIVO</b> Minimum Essential Medium (MEM)	2/22	Prodotto commerciale
3	<b>NEGATIVO</b> Minimum Essential Medium (MEM)	2/22	Prodotto commerciale
4	<b>IHN DK 21-4070</b> Danish Isolate from 12 <sup>nd</sup> May 2021 Kindly provided from EURLFISH (DTU-AQUA, Copenhagen)	3/22	5° EPC
5	<b>Coinfezione</b>	1/23	
	<b>IPNv</b> 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.	1/23	15° BF-2
	<b>IHN DK 21-4070</b> Danish Isolate from 12 <sup>nd</sup> May 2021 Kindly provided from EURLFISH (DTU-AQUA, Copenhagen)	1/23	5° EPC

La sterilità del materiale liofilizzato è stata confermata 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:

- DTU EURL AQUA FISH VHS-IHN VERS 2 2021
- Ricerca del virus della Necrosi Pancreatica Infettiva mediante isolamento su colture cellulari (PDP ITT 013 rev. 07)
- Identificazione del virus della Necrosi pancreatica infettiva mediante immunofluorescenza (PDP ITT 024 rev. 02)
- WOH Manual for Aquatic Animals Cap. 2.3.9 par. 4.3 e 4.9.2 2023

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  $10^2 - 10^8$  TCID<sub>50</sub>/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 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 ( $\pm 1$  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 n 1 e in tabella n 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° 5 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	SVCV	NEG	NEG	IHN	IHN+IPN
POST LIOFILIZZAZIONE	10/08/2023	Media 5 osservazioni	5,08	0,00	0,00	4,66	3,85
		Deviazione standard	0,25			0,08	0,29
		Incertezza	0,11			0,04	0,13
INIZIO CIRCUITO	13/10/2023	Media 5 osservazioni	4,95	0,00	0,00	4,59	4,08
		Deviazione standard	0,21			0,05	0,25
		Incertezza	0,09			0,02	0,11
FINE CIRCUITO	14/12/2023	Media 5 osservazioni	4,69	0,00	0,00	4,79	4,46
		Deviazione standard	0,19			0,20	0,05
		Incertezza	0,09			0,09	0,02
BF-2							
Momento di osservazione	Data	Statistica	SVCV	NEG	NEG	IHN	IHN+IPN
POST LIOFILIZZAZIONE	10/08/2023	Media 5 osservazioni	4,05	0,00	0,00	3,84	3,63
		Deviazione standard	0,35			0,28	0,26
		Incertezza	0,16			0,13	0,12
INIZIO CIRCUITO	13/10/2023	Media 5 osservazioni	3,63	0,00	0,00	3,61	3,51



		Deviazione standard	0,17			0,09	0,10
		Incertezza	0,08			0,04	0,04

FINE CIRCUITO	14/12/2023	Media 5 osservazioni	3,74	0,00	0,00	3,90	3,48
		Deviazione standard	0,16			0,22	0,02
		Incertezza	0,07			0,10	0,02

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**

	SVCV	NEG	NEG	IHN	IHN+IPN
<b>EPC</b>	0,26	0	0	0,20	0,38
<b>BF-2</b>	0,11	0	0	0,29	0,03

Lo scostamento delle medie delle titolazioni è inferiore a 1 logaritmo.

## 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 17/10/2023 al 22/12/2023.

## 3. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale del circuito AQUA IV 1-23, 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 UNI ISO 13528:2022, 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**

Sei (6) laboratori su 7 partecipanti al circuito hanno identificato correttamente il contenuto di tutti i flaconi totalizzando quindi il punteggio massimo di 10.

Il laboratorio L000549 non ha identificato uno dei due virus presenti nel flacone 5 (coinfezione) e pertanto ha ottenuto un punteggio di 9.

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 1-23**

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	Flacone	ELISA	Identificazione in ELISA	IF	Identificazione in IF	RT-PCR	Identificazione in RT-PCR	Altro	Identificazione in altro metodo	Punteggio ottenuto
L000394	19/10/2023	20/11/2023	Flacone 1	NE		NE		P	SVCV	P	molte particelle riferibili a rabdovirus	10
			Flacone 2	NE		NE		N		N		
			Flacone 3	NE		NE		N		N		
			Flacone 4	NE		NE		P	IHNv	P	particelle riferibili a rabdovirus	
			Flacone 5	NE		NE		P	IPNV e IHNV	P	particelle riferibili a Birnavirus	
L000410	17/10/2023	19/10/2023	Flacone 1	NE		P	SVCv	NE		NE		10
			Flacone 2	NE		N		NE		NE		
			Flacone 3	NE		N		NE		NE		
			Flacone 4	NE		P	IHNv	NE		NE		
			Flacone 5	NE		P	IHNv-IPNV	NE		NE		
L000417	17/10/2023	09/11/2023	Flacone 1	NE		NE		P	SVC	NE		10
			Flacone 2	NE		NE		N		NE		
			Flacone 3	NE		NE		N		NE		
			Flacone 4	NE		NE		P	IHN	NE		
			Flacone 5	NE		NE		P	IHN - IPN	NE		
L000438	17/10/2023	30/10/2023	Flacone 1	NE		P	SVC	N		NE		10
			Flacone 2	NE		N		N		NE		
			Flacone 3	NE		N		N		NE		
			Flacone 4	NE		P	IHN	P	IHN	NE		
			Flacone 5	NE		P	IHN; IPN	P	IHN	NE		

IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci  
Report definitivo emesso il 21/02/2024

L000456	18/10/2023	18/10/2023	Flacone 1	NE		P	SVC	P	SVC	NE	10
			Flacone 2	NE		N		N		NE	
			Flacone 3	NE		N		N		NE	
			Flacone 4	NE		P	IHN	P	IHN	NE	
			Flacone 5	NE		P	IHN + IPN	P	IHN + IPN	NE	
L000549	17/10/2023	14/11/2023	Flacone 1	NE		P	SVCV	NE		NE	9
			Flacone 2	NE		N		NE		NE	
			Flacone 3	NE		N		NE		NE	
			Flacone 4	NE		P	IHN	NE		NE	
			Flacone 5	NE		P	IPNV	NE		NE	
L000682	23/10/2023	31/10/2023	Flacone 1	NE		P	SVC	P	SVC	NE	10
			Flacone 2	NE		N		N		NE	
			Flacone 3	NE		N		N		NE	
			Flacone 4	NE		P	IHN	P	IHN	NE	
			Flacone 5	NE		P	IHN, IPN	P	IHN, IPN	NE	

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

## **6. Commenti generali sulla sensibilità delle colture cellulari utilizzate dai partecipanti (non soggetti all'accreditamento UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010)**

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**

Codice laboratorio	Data	Linea cellulare	Origine	N°passaggio	Terreno	Supplementi
L000394	23/10/2023	EPC	IZS Venezie	296	EMEM- Sigma	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,
		BF-2	IZS Venezie	153	EMEM- Sigma	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,
L000410	19/10/2023	EPC	IZSve- EURL (DVL) Danimarca	229.13.10.36	Mem- earle	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 1% Antibiotici,
		BF-2	IZSve- EURL (DVL) Danimarca	384.40.36	Mem- earle	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 1% Antibiotici,
L000438	30/10/2023	EPC	PD	229.13.18.2	MEM GIBCO	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 5% Antibiotici, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,
		BF-2	PD	384.59.2	MEM GIBCO	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 5% Antibiotici, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,
L000456	18/10/2023	EPC	IZSVE	59	MEM + EAGLE	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA,
		BF-2	IZSLER	138	MEM + EAGLE	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA,
L000549	14/11/2023	EPC	IZSve	229.13.10.26.2	MEM	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,
		BF-2	IZSve	384.40.211.29	MEM	10% SFB, 1% L- GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL,
L000682	31/10/2023	EPC	IZSVE	475	MEM	10% SFB, 5% Antibiotici,
		BF-2	IZSVE	480	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 TCID<sub>50</sub>/25µl**

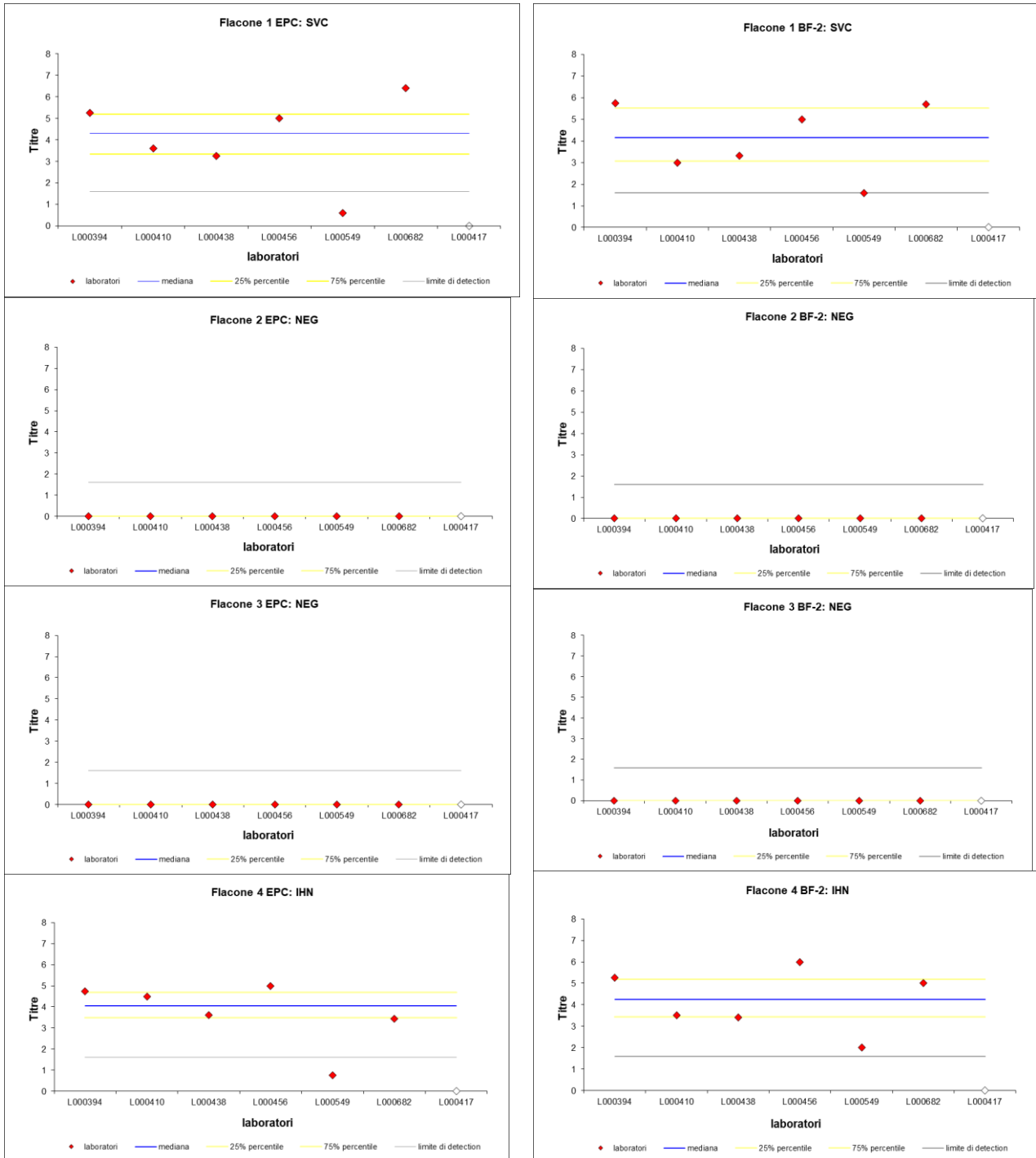
	<b>Cod Partecipante</b>	<b>SVC</b>	<b>NEG</b>	<b>NEG</b>	<b>IHN</b>	<b>IHN+IPN</b>
<b>EPC</b>	L000394	5,25	0,00	0,00	4,75	4,50
	L000410	3,60	0,00	0,00	4,50	4,40
	L000438	3,25	0,00	0,00	3,60	4,75
	L000456	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00
	L000549	0,60	0,00	0,00	0,75	2,25
	L000682	6,41	0,00	0,00	3,44	5,85
	L000417	-	-	-	-	-
<b>BF</b>	L000394	5,75	0,00	0,00	5,25	4,75
	L000410	3,00	0,00	0,00	3,50	3,75
	L000438	3,31	0,00	0,00	3,40	4,50
	L000456	5,00	0,00	0,00	6,00	5,00
	L000549	1,60	0,00	0,00	2,00	4,25
	L000682	5,70	0,00	0,00	5,00	6,00
	L000417	-	-	-	-	-

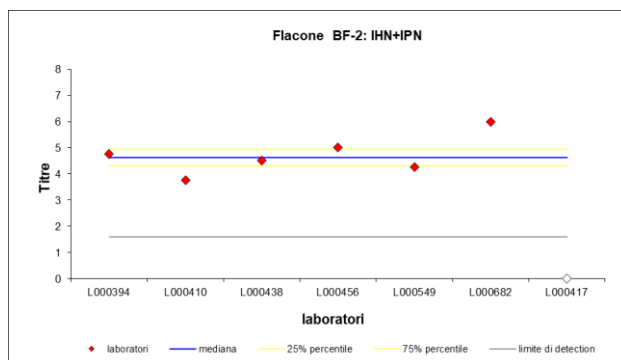
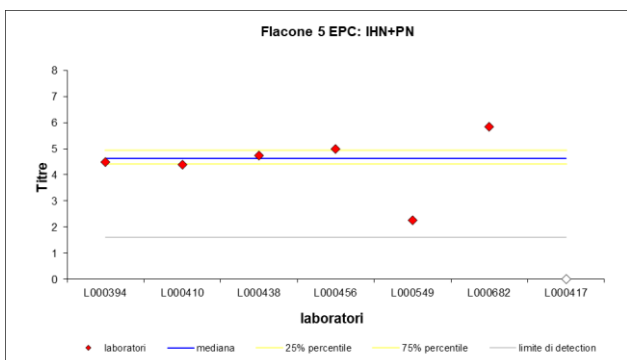
**Tabella 7: Statistiche di sintesi dei titoli virali ottenuti dai diversi partecipanti allo schema (espressi come valore dell'esponente) per virus e linea cellulare**

<b>EPC</b>	<b>Flacone 1 SVC</b>	<b>Flacone 2 NEG</b>	<b>Flacone 3 NEG</b>	<b>Flacone 4 IHN</b>	<b>Flacone 5 IHN+IPN</b>
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	4,30	0,00	0,00	4,05	4,63
Titolo massimo	6,41	0,00	0,00	5,00	5,85
Titolo minimo	0,60	0,00	0,00	0,75	2,25
25% quartile	3,34	0,00	0,00	3,48	4,43
75% quartile	5,19	0,00	0,00	4,69	4,94

<b>BF</b>	<b>Flacone 1 SVC</b>	<b>Flacone 2 NEG</b>	<b>Flacone 3 NEG</b>	<b>Flacone 4 IHN</b>	<b>Flacone 5 IHN+IPN</b>
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	4,16	0,00	0,00	4,25	4,63
Titolo massimo	5,75	0,00	0,00	6,00	6,00
Titolo minimo	1,60	0,00	0,00	2,00	3,75
25% percentile	3,08	0,00	0,00	3,43	4,31
75% percentile	5,53	0,00	0,00	5,19	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;

$\sigma_{pt}$  = 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:

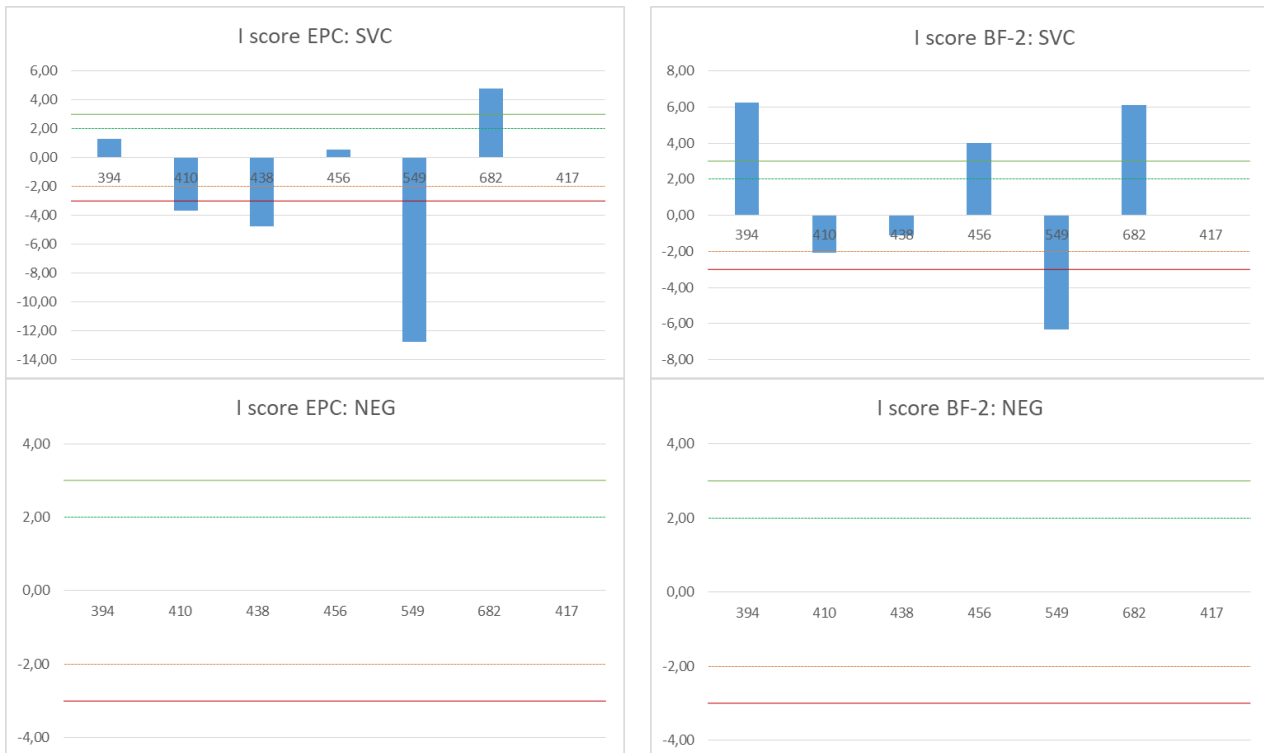
I-score < -3	Titolazione molto sottostimata rispetto alla media
-3 ≤ I-score < -2	Titolazione sottostimata rispetto alla media
-2 ≤ I-score < 2	Titolazione in media
2 ≤ I-score < 3	Titolazione sovrastimata rispetto alla media
I-score ≥ 3	Titolazione molto sovrastimata rispetto alla media

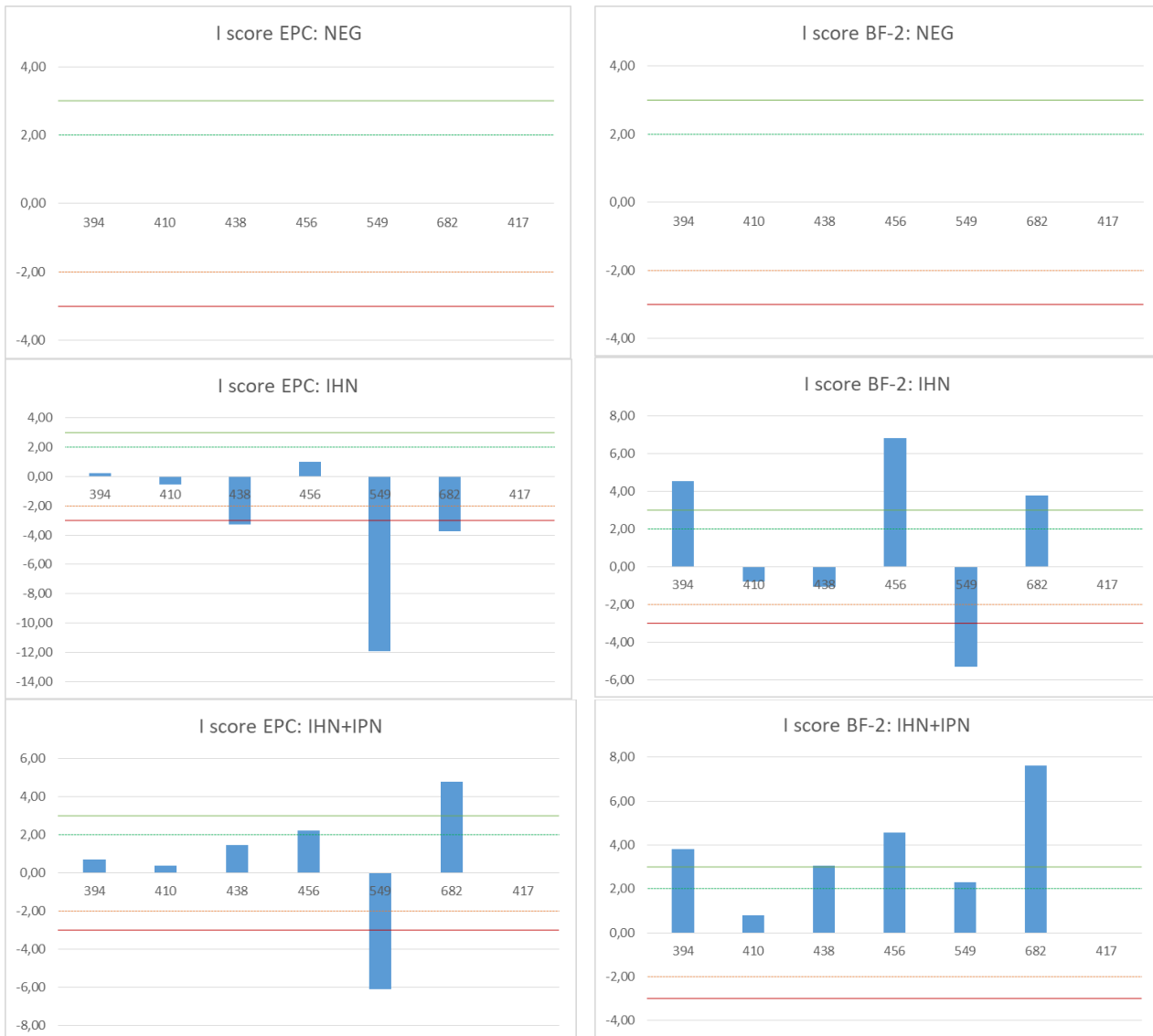
L'information score, ottenuto dal confronto del titolo virale di ogni partecipante con il titolo medio ottenuto dall'organizzatore del circuito in fase di verifica dell'idoneità dei campioni prova, rapportato ad una variabilità definita "accettabile" dall'organizzatore del circuito stesso, fornisce una 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. Si fornisce quindi l'I score in figura 3.

**Figura 3: Information score (I) dei laboratori partecipanti al CI AQUA IV 1-23**





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 incide sulla 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 L00549 osserva titoli molto sottostimati per i flaconi 1-4-5 con la linea acellulare EPC e per i flaconi 1-4 con la linea cellulare BF-2.

Il laboratorio L00410 osserva per il flacone 1 titoli molto sottostimati con la linea cellulare EPC e sottostimati con la linea BF-2.

Il laboratorio L00438 osserva per i flaconi 1 e 4 titoli molto sottostimati con la linea cellulare EPC.

## 7. Conclusioni

Sei (6) laboratori su 7 hanno identificato correttamente i virus contenuti nei campioni prova. Solo il laboratorio L000549 non ha correttamente identificato uno dei due virali presenti nel flacone 5. Tale laboratorio ha quindi totalizzato 9 punti su 10, riportando un giudizio comunque accettabile. Alla luce dei risultati ottenuti nel corso delle valutazioni aggiuntive di carattere informativo sulla sensibilità delle colture cellulari dei partecipanti si consiglia al laboratorio L000549 di monitorare attentamente le linee cellulari in uso poiché questo laboratorio rileva titoli molto sottostimati in tutti i campioni con la linea cellulare EPC e in quasi tutti i campioni con la linea BF-2.



**SCHEMA AQUA IV 2-23: 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 2-23**

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO
1	<b>KHV 07/108b</b> 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	4/21
2	<b>KHV 07/108b</b> 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	3/21
3	<b>KHV 197/ITT12</b> Pretto, Manfrin, Ceolin, Dalla Pozza, Zelco, Quartesan, Abbadi, Panzarin, Toffan First isolation of koi herpes virus (KHV) in Italy from imported koi ( <i>Cyprinus carpio</i> koi) 126, EAEP Bulletin, 33(4) 2013	1/22
4	<b>KHV 197/ITT12</b> Pretto, Manfrin, Ceolin, Dalla Pozza, Zelco, Quartesan, Abbadi, Panzarin, Toffan First isolation of koi herpes virus (KHV) in Italy from imported koi ( <i>Cyprinus carpio</i> koi) 126, EAEP Bulletin, 33(4) 2013.	2/22
5	<b>KHV 07/108b</b> 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	1/21

## 1.2 Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova

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

- Rilevazione dell'Herpes virus della Carpa Koi (KHV) mediante real time PCR (PDP ITT 101 rev. 04)

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, lo schema è stato considerato stabile.

## 2. Invio e risospensione dei campioni

Ogni laboratorio ha ricevuto n°5 flaconi. La procedura contenente le modalità operative da seguire per l'identificazione è disponibile nella piattaforma AQUAweb.

Periodo per l'esecuzione delle prove: dal 17/10/2023 al 22/12/2023.

## 3. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale del circuito AQUA IV 2-23, 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 UNI ISO 13528:2022, 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 8 punti del massimo punteggio ottenibile.

## 5. Risultati circuito

Cinque (5) laboratori su 6 partecipanti al circuito hanno identificato il contenuto totalizzando quindi il punteggio massimo di 10. Il laboratorio L000410 non ha identificato il contenuto di 1 flacone ed ha quindi totalizzato 8 punti.

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**

Cinque (5) laboratori su 6 hanno identificato i virus contenuti nei campioni prova. L'unico errore riportato dal laboratorio 410 si riferisce al campione debolmente positivo (flacone 1).

**Tabella 2: Risultati e punteggio complessivo dei laboratori partecipanti al circuito interlaboratorio AQUA IV 2-23**

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	Metodo d'analisi	Flacone	Esito	Ct (se presente)	Punteggio ottenuto
L000394	28/11/2023	07/12/2023	Gilad et al. Concentrations of a KOI Herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected cyprinus carpio Koi as assessed by real time TaqMan PCR Diseases of Aquatic Organisms (2004); Vol. 60; pp: 179 - 187	1	P	38,1	10
				2	P	34,84	
				3	P	33,37	
				4	P	33,42	
				5	P	34,37	
L000410	23/11/2023	24/11/2023	End Point - manuale OIE	1	N		8
				2	P		
				3	P		
				4	P		
				5	P		
L000417	14/11/2023	14/11/2023	PCR Real Time metodo LNR IZSVe	1	P	34,41	10
				2	P	33,14	
				3	P	34,64	
				4	P	33,41	
				5	P	33,08	
L000438	07/11/2023	28/11/2023	Real time RT-PCR (Gilad et al., 2004)	1	P	35,4	10
				2	P	31,74	
				3	P	32,7	
				4	P	32	
				5	P	32,21	
L000549	28/11/2023	28/11/2023	Real time PCR	1	P	33,3	10
				2	P	30,02	
				3	P	30,06	
				4	P	29,66	
				5	P	30	
L000682	25/10/2023	25/10/2023	End Point PCR - Bercovier et al., 2005	1	P		10
				2	P		
				3	P		
				4	P		
				5	P		

Legenda: i risultati errati vengono segnati in rosso

## Conclusioni Generali AQUA IV 2-23

Nel presente report sono riportati i risultati del circuito annuale interlaboratorio AQUA IV 2023 organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei pesci.

Nel complesso i risultati del circuito AQUA IV 2023 sono stati soddisfacenti per entrambi gli schemi. I risultati qui presentati verranno discussi durante la consueta riunione di aggiornamento degli I.ZZ.SS. che verrà organizzata dal Centro di Riferenza in giugno 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](mailto: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](mailto: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 21/02/2024



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

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