



Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati



Circuito di virologia organismi acquatici

Report definitivo schemi AQUA IV 1-24 e IV 2-24

Anno erogazione 2024

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
SCHEMA AQUA IV 1-24: 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.....	9
3. Valori assegnati	9
4. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance	9
5. Risultati schema AQUA IV 1-24.....	10
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	18
7. Conclusioni schema AQUA IV 1-24	20
SCHEMA AQUA IV 2-24: Rilevazione del DNA del virus KHV (CyHV-3).....	21
8. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni.....	21
8.1 Composizione dei campioni prova	21
8.2 Valutazione della omogeneità del lotto dei campioni prova	22
8.3 Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova	22
9. Invio e risospensione dei campioni.....	22
10. Valori assegnati	22
11. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance	22
12. Risultati schema AQUA IV 2-24.....	22
13. Conclusioni schema AQUA IV 2-24	23
14. Conclusioni Generali CI AQUA IV	25
15. Informativa sulla privacy	25



Report definitivo

Introduzione

Nei mesi di Ottobre-Dicembre 2024, 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 sei (6) 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 2024 sono stati i seguenti:

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

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

- IV 1-24 "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 2-24 "Rilevazione del DNA dell' 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.

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 1-24: 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 cinque (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 nella piattaforma AQUAweb.

Tabella 1: Composizione dello schema AQUA IV 1-24

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO	N° DI PASSAGGI E LINEA CELLULARE
1	Coinfezione	1/24	
	VHS F1 Jensen M. (1965). Research on the virus of Egtved disease. Ann NY A cad Sci 126:422-426	5/23	33° su EPC
	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.	2/23	9° su EPC
2	VHS F1 Jensen M. (1965). Research on the virus of Egtved disease. Ann NY A cad Sci 126:422-426	4/23	33° su EPC
3	IHN DK 21-4070 Danish Isolate from 12 nd May 2021 Kindly provided from EURLFISH (DTU-AQUA, Copenhagen)	3/22	5° su EPC
4	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.	1/21	1° su EPC
5	SVCv 56/70 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° su EPC

La sterilità del materiale liofilizzato è stata confermata mediante semina su TSB addizionato di estratto di lievito e successiva incubazione per sette giorni a 37°C. Contemporaneamente è stato allestito anche un campione su terreno sabouraud, incubato a 25°C per sette 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 NPI/IPN mediante isolamento in colture cellulari e identificazione in immunofluorescenza (PDP ITT 013 rev. 08)
- WOH Manual for Aquatic Animals Cap. 2.3.9 par. 4.3 e 4.9.2 2023

La titolazione viene effettuata su cinque (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. Le prove effettuate sono quindi le medesime applicate in fase di omogeneità. 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° 5 flaconi per istante temporale) nelle due linee cellulari utilizzate

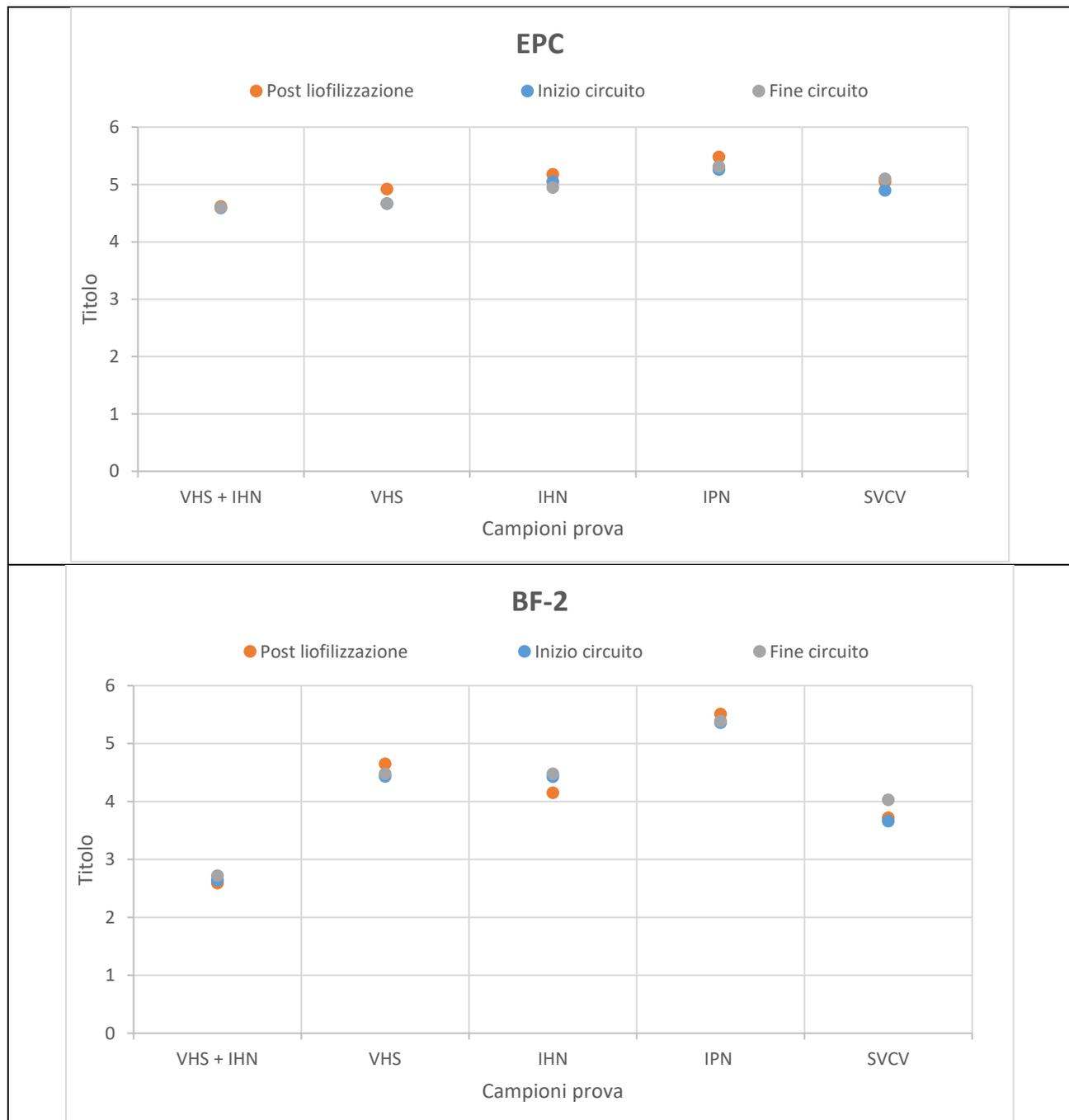


Tabella 2: statistica descrittiva dei valori delle titolazioni per virus e linea cellulare

EPC							
Momento di osservazione	Data	Statistica	Flacone 1 VHS+IHN	Flacone 2 VHS	Flacone 3 IHN	Flacone 4 IPN	Flacone 5 SVC
POST LIOFILIZZAZIONE	26/08/2024	Media 5 osservazioni	4,62	4,92	5,18	5,48	5,05
		Deviazione standard	0,13	0,31	0,18	0,08	0,21
		Incertezza	0,06	0,14	0,08	0,04	0,09
INIZIO CIRCUITO	07/10/2024	Media 5 osservazioni	4,59	4,67	5,05	5,26	4,90
		Deviazione standard	0,10	0,12	0,11	0,16	0,22
		Incertezza	0,05	0,05	0,05	0,07	0,10
FINE CIRCUITO	12/12/2024	Media 5 osservazioni	4,60	4,67	4,95	5,31	5,10
		Deviazione standard	0,14	0,12	0,11	0,08	0,22
		Incertezza	0,06	0,05	0,05	0,04	0,10
BF-2							
Momento di osservazione	Data	Statistica	Flacone 1 VHS+IHN	Flacone 2 VHS	Flacone 3 IHN	Flacone 4 IPN	Flacone 5 SVC
POST LIOFILIZZAZIONE	26/08/2024	Media 5 osservazioni	2,59	4,65	4,15	5,51	3,72
		Deviazione standard	0,10	0,14	0,14	0,14	0,07
		Incertezza	0,05	0,06	0,06	0,06	0,03
INIZIO CIRCUITO	07/10/2024	Media 5 osservazioni	2,64	4,43	4,43	5,36	3,66
		Deviazione standard	0,11	0,06	0,11	0,11	0,08
		Incertezza	0,05	0,03	0,05	0,05	0,04
FINE CIRCUITO	12/12/2024	Media 5 osservazioni	2,72	4,48	4,48	5,39	4,03
		Deviazione standard	0,07	0,08	0,04	0,09	0,10
		Incertezza	0,03	0,04	0,02	0,04	0,10

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

	Flacone 1 VHS + IHN	Flacone 2 VHS	Flacone 3 IHN	Flacone 4 IPN	Flacone 5 SVC
EPC	0,01	0	0,1	0,05	0,2
BF-2	0,08	0,05	0,05	0,03	0,37

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 15/10/2024 al 23/12/2024.

3. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale dello schema AQUA IV 1-24, 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 schema AQUA IV 1-24

Sei (6) laboratori su sei (6) partecipanti allo schema hanno identificato correttamente il contenuto di tutti i flaconi totalizzando quindi il punteggio massimo di 10.

Il laboratorio L000549 si è ritirato dalla partecipazione al circuito e non avendo fornito risultati non è incluso nell'elaborazione del presente report.

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 allo schema AQUA IV 1-24

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	16/10/2024	25/11/2024	Flacone 1	NE		NE		NE		P	IHN e VHS	10
			Flacone 2	NE		NE		NE		P	VHS	
			Flacone 3	NE		NE		NE		P	IHN	
			Flacone 4	NE		NE		NE		P	IPN	
			Flacone 5	NE		NE		NE		P	SVC	
L000410	16/10/2024	15/11/2024	Flacone 1	NE		P	VHS+IHN	NE		NE		10
			Flacone 2	NE		P	VHS	NE		NE		
			Flacone 3	NE		P	IHN	NE		NE		
			Flacone 4	NE		P	IPN	NE		NE		
			Flacone 5	NE		P	SVC	NE		NE		
L000417	16/10/2024	12/11/2024	Flacone 1	NE		NE		NE		P	IHN - VHS	10
			Flacone 2	NE		NE		NE		P	VHS	
			Flacone 3	NE		NE		NE		P	IHN	
			Flacone 4	NE		NE		NE		P	IPN	
			Flacone 5	NE		NE		NE		P	SVC	
L000438	16/10/2024	08/11/2024	Flacone 1	NE		P	VHS, IHN	NE		P	VHS, IHN	10
			Flacone 2	NE		P	VHS	NE		P	VHS	
			Flacone 3	NE		P	IHN	NE		P	IHN	
			Flacone 4	NE		P	IPN	NE		N		
			Flacone 5	NE		P	SVC	NE		N		

L000456	16/10/2024	31/10/2024	Flacone 1	NE		P	VHS+IHN	NE		P	VHS+IHN	10
			Flacone 2	NE		P	VHS	NE		P	VHS	
			Flacone 3	NE		P	IHN	NE		P	IHN	
			Flacone 4	NE		P	IPN	NE		P	IPN	
			Flacone 5	NE		P	SVC	NE		P	SVC	
L000682	17/10/2024	28/10/2024	Flacone 1	NE		P	VHS, IHN	NE		P	VHS, IHN	10
			Flacone 2	NE		P	VHS	NE		P	VHS	
			Flacone 3	NE		P	IHN	NE		P	IHN	
			Flacone 4	NE		P	IPN	NE		P	IPN	
			Flacone 5	NE		P	SVCv	NE		P	SVCv	

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

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

Codice laboratorio	Data	Linea cellulare	Origine	N°passaggio	Terreno	Supplementi
L000394	19/11/2024	EPC	IZSVe	300	EMEM Sigma con sali di Earle e NaHCO3 ridotto	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL
		BF-2	IZSVe	154	EMEM Sigma con sali di Earle e NaHCO3 ridotto	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici, TRIS-HCL
L000410	15/11/2024	EPC	IZSVe-EURL (DVL) Danimarca	229.13.10	MEM EARLE	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici
		BF-2	IZSVe-EURL (DVL) Danimarca	384.40	MEM EARLE	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 1% Antibiotici
L000438	08/11/2024	EPC	IZSVe	229.13.10.33.3	MEM GIBCO	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 5% Antibiotici, 1% Antibiotici, TRIS-HCL
		BF-2	IZSVe	384.40.37.3	MEM GIBCO	10% SFB, 1% L-GLUTAMINA, 5% Antibiotici, 1% Antibiotici, TRIS-HCL
L000456	31/10/2024	EPC	IZSVe	66	MEM	10% SFB
		BF-2	IZSLER	141	MEM	10% SFB
L000682	28/10/2024	EPC	IZSVe	523	MEM	10% SFB, 5% Antibiotici
		BF-2	IZSVe	510	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

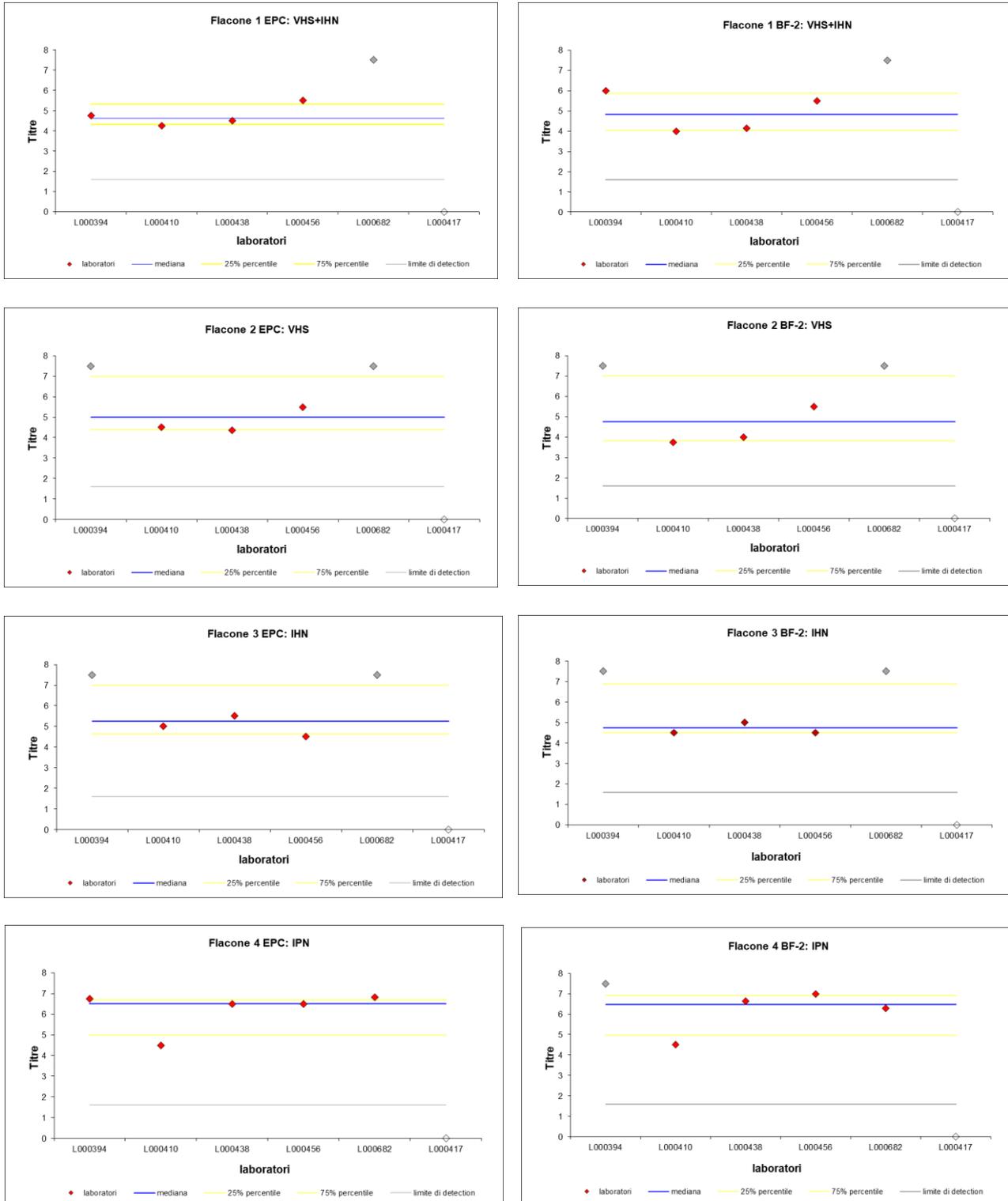
	Codice Laboratorio	Flacone 1 VHS+ IHN	Flacone 2 VHS	Flacone 3 IHN	Flacone 4 IPN	Flacone 5 SVC
EPC	L000394	4,75	7,50	7,50	6,75	6,75
	L000410	4,25	4,50	5,00	4,50	3,00
	L000438	4,50	4,36	5,50	6,50	4,50
	L000456	5,50	5,50	4,50	6,50	5,50
	L000682	7,50	7,50	7,50	6,82	7,50
	L000417	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BF-2	L000394	6,00	7,50	7,50	7,50	7,50
	L000410	4,00	3,75	4,50	4,50	2,75
	L000438	4,16	4,00	5,00	6,64	4,25
	L000456	5,50	5,50	4,50	7,00	5,50
	L000682	7,50	7,50	7,50	6,30	6,46
	L000417	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

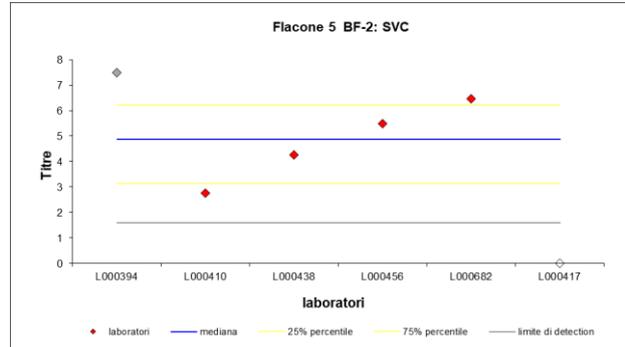
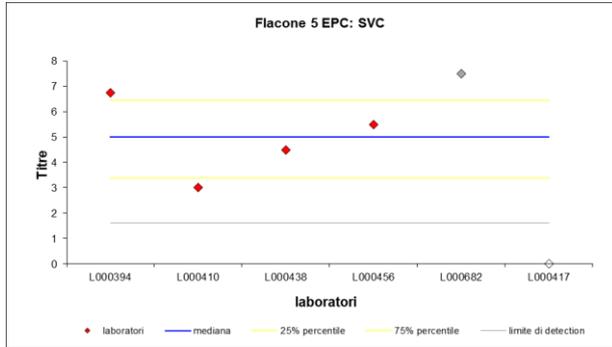
Tabella 7: Statistiche di sintesi dei titoli virali ottenuti dai diversi partecipanti allo schema (espressi come valore dell'esponente) per virus e linea cellulare

EPC	Flacone 1 VHS+ IHN	Flacone 2 VHS	Flacone 3 IHN	Flacone 4 IPN	Flacone 5 SVC
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	4,63	5,00	5,25	6,50	5,00
Titolo massimo	7,50	7,50	7,50	6,82	7,50
Titolo minimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25% quartile	4,31	4,40	4,63	5,00	3,38
75% quartile	5,31	7,00	7,00	6,69	6,44

BF-2	Flacone 1 VHS+ IHN	Flacone 2 VHS	Flacone 3 IHN	Flacone 4 IPN	Flacone 5 SVC
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	4,83	4,75	4,75	6,47	4,88
Titolo massimo	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
Titolo minimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25% percentile	4,04	3,81	4,50	4,95	3,13
75% percentile	5,88	7,00	6,88	6,91	6,22

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:

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

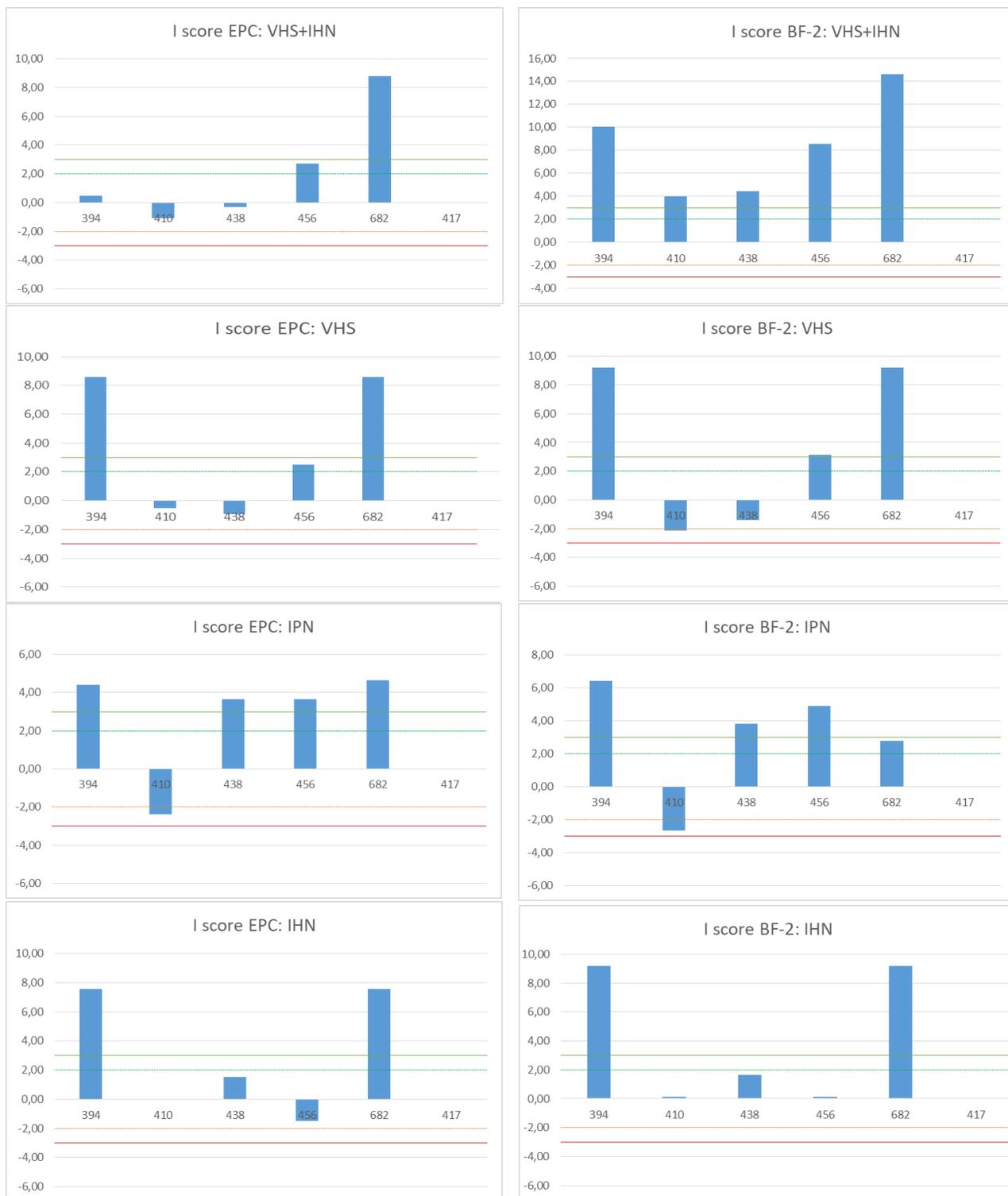
L'interpretazione dell'I-score o I'-score è la seguente:

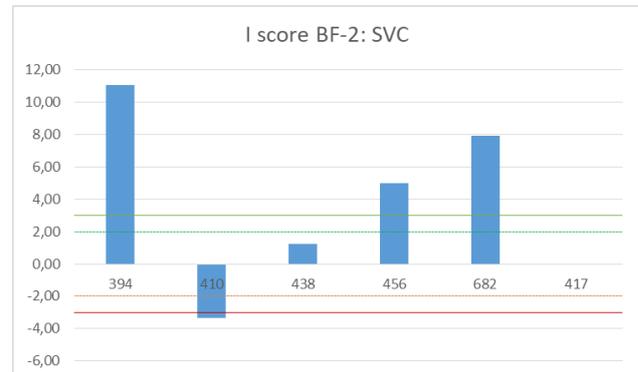
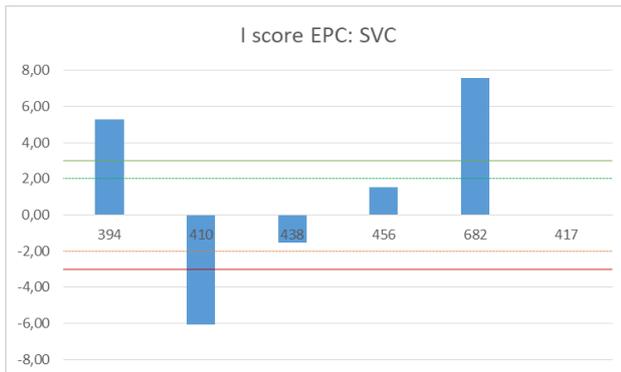
I-score < -3	Titolazione molto sottostimata rispetto alla media
-3 ≤ I-score < -2	Titolazione sottostimata rispetto alla media
-2 ≤ I-score < 2	Titolazione in media
2 ≤ I-score < 3	Titolazione sovrastimata rispetto alla media
I-score ≥ 3	Titolazione molto sovrastimata rispetto alla media

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. Si fornisce quindi l'I score in Figura 3.

Figura 3: Information score (I) dei laboratori partecipanti allo schema AQUA IV 1-24





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 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. Nel corso del presente circuito il laboratorio L000394 osserva titoli molto sovrastimati per tutti i virus e con entrambe le linee cellulari con la sola eccezione del flacone 1 (VHS+IHN) con la linea cellulare EPC.

Il laboratorio L000410 osserva titoli molto sottostimati con la linea EPC e BF-2 per il flacone n° 5 (SVC) e titoli sottostimati per entrambe le linee per il flacone 3 (IPN).

Il laboratorio L000438 osserva titoli molto sovrastimati con entrambe le linee per il flacone 3 (IPN).

Il laboratorio L000456 osserva titoli da sovrastimati a molto sovrastimati con la linea cellulare BF-2 con tutti i virus ad eccezione del flacone 4 (IHN) ed per la sola linee EPC con il flacone 5.

Il laboratorio L000682 osserva titoli molto sovrastimati per tutti i virus e con entrambe le linee cellulari.

È da sottolineare che in tutti i casi in cui il valore assegnato risulti pari a $10^{7,50}$ TCID₅₀/25µl, esso è da interpretarsi come $>10^{7,50}$ TCID₅₀/25µl. Non avendo fornito il partecipante la diluizione limite (ovvero la diluizione dove almeno il 50% dei pozzetti è negativo) non è stato possibile applicare la formula di calcolo prevista. Per motivi di elaborazione grafica tale valore è stato raffigurato come valore netto (pari a $10^{7,50}$ TCID₅₀/25µl) nei grafici in Figura 2 evidenziando il simbolo relativo con il colore grigio.

Il laboratorio L000417 non ha effettuato la titolazione virale, pertanto nei grafici in Figura 2 il simbolo relativo è di colore bianco.

7. Conclusioni schema AQUA IV 1-24

Sei (6) laboratori su sei (6) hanno identificato correttamente i virus contenuti nei campioni prova confermando quindi la capacità diagnostica dei laboratori partecipanti.

Un laboratorio si è ritirato dalla partecipazione al circuito e quindi non ha fornito i risultati.

Alla luce dei risultati ottenuti nel corso delle valutazioni aggiuntive di carattere informativo sulla sensibilità delle colture cellulari si evidenzia per quasi tutti i laboratori, e con particolare riferimento ai laboratori L000394 e L000682, una importante sovrastima dei titoli virali. Sebbene questa anomalia non abbia influito sulla corretta identificazione dei virus inclusi nel presente schema si invitano i laboratori interessati a rivedere le procedure in uso allo scopo di evidenziarne la causa.

SCHEMA AQUA IV 2-24: Rilevazione del DNA del virus KHV (CyHV-3)

8. Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni

8.1 Composizione dei campioni prova

Ad ogni laboratorio sono stati inviati cinque (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 (Tabella 8). 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 8: Composizione dello schema AQUA IV 2-24

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO
1	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	4/18
2	MEM 50% MEM Sigma lotto RNBG4909 + 50% Lattoalbumina al 20%	1/22
3	KHV 197/ITT12 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 koi</i>) 126, EAAP Bulletin, 33(4) 2013	1/22
4	MEM 50% MEM Sigma lotto RNBG4909 + 50% Lattoalbumina al 20%	1/22
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	1/23

8.2 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.

8.3 Valutazione della stabilità del lotto dei campioni prova

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

9. Invio e risospensione dei campioni

Ogni laboratorio ha ricevuto cinque (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 15/10/2024 al 23/12/2024.

10. Valori assegnati

Per le prove qualitative di identificazione virale dello schema AQUA IV 2-24 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.

11. 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 8 punti del massimo punteggio ottenibile.

12. Risultati schema AQUA IV 2-24

Cinque (5) laboratori su cinque (5) partecipanti allo schema hanno identificato il contenuto
IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci
Report definitivo emesso il 04/03/2025

totalizzando quindi il punteggio di 10.

Il laboratorio L000549 si è ritirato dalla partecipazione al circuito e non avendo fornito risultati non è incluso nell'elaborazione del presente report.

In Tabella 9 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

13. Conclusioni schema AQUA IV 2-24

Cinque (5) laboratori su cinque (5) hanno individuato i virus contenuti nei campioni prova ottenendo il massimo punteggio anche nei campioni a bassa carica virale (flacone 3 e 5). Un laboratorio si è ritirato dalla partecipazione al circuito e quindi non ha fornito i risultati.

Non si evidenziano problematiche particolari relativamente alla identificazione di questo patogeno.

Tabella 9: Risultati e punteggio complessivo dei laboratori partecipanti allo schema AQUA IV 2-24

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	metodo d'analisi	Flacone	esito	Ct (se presente)	Punteggio ottenuto
L000394	11/11/2024	12/11/2024	Real time PCR - Oren Gilad et al. Diseases of Aquatic Organisms 2004; 60:179-187	1	P	28,95	10
				2	N		
				3	P	31,44	
				4	N		
				5	P	31,08	
L000410	04/11/2024	05/11/2024	PCR End Point manuale OIE	1	P		10
				2	N		
				3	P		
				4	N		
				5	P		
L000417	11/11/2024	11/11/2024	PCR Real Time metodo LNR IZSVe	1	P	32	10
				2	N		
				3	P	33	
				4	N		
				5	P	34	
L000438	25/11/2024	16/12/2024	Real time PCR (EURL for Fish and Crustacean Diseases par Ill.1 2023)	1	P	30	10
				2	N		
				3	P	31,4	
				4	N		
				5	P	33,3	
L000682	17/10/2024	18/10/2024	End Point PCR - Bercovier et al., 2005	1	P		10
				2	N		
				3	P		
				4	N		
				5	P		

Legenda: i risultati errati vengono segnati in rosso

IZSVe – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci
Report definitivo emesso il 04/03/2025

14. Conclusioni Generali CI AQUA IV

Nel presente report sono riportati i risultati del circuito annuale interlaboratorio AQUA IV 2024 organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei pesci.

I risultati del circuito AQUA IV 2024 sono stati soddisfacenti in quanto tutti i laboratori partecipanti hanno ottenuto il massimo punteggio.

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

Si sottolinea l'importanza della continua partecipazione ai circuiti interlaboratorio per il mantenimento della qualità dei risultati dei laboratori.

15. 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 04/03/2025



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

----- Fine report definitivo -----

*IZSve – Centro di Referenza Nazionale per le malattie dei pesci
Report definitivo emesso il 04/03/2025*