

*Aprile 2017*

**Risultati Circuito IV-16  
Schema virologia degli organismi  
acquatici: quantitativo e qualitativo  
(titolazione e identificazione)**

---

Responsabile Circuito interlaboratorio AQUA IV-2016  
*Dr. / Dr.ssa Anna Toffan Fax 049/8084360 Tel. 049/8084333*  
*e-mail atoffan@izsvenezie.it*

Responsabili tecnici  
*Dr. / Dr.ssa Ferro Daniela - Quartesan Rosita Tel. 049/8084388*  
*e-mail dferro@izsvenezie.it; rquartesan@izsvenezie.it*

Responsabile statistico  
*Dr. / Dr.ssa Mancin Marzia Tel.049/8084431*  
*e-mail mmancin@izsvenezie.it*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie  
Lab. Virologia Speciale degli animali acquatici

V.le dell'Università 10 – 35020 LEGNARO (PD)  
[www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it)

# **Circuito interlaboratorio AQUA-IV 2016**

## **Report definitivo**

### **Introduzione**

Nei mesi di Novembre e Dicembre 2016, in ottemperanza a quanto previsto dall'art.52 del Dlgs 148/2008 ed art. 2 del Decreto 4 ottobre 1999, del Ministero della Sanità, il Centro di Referenza Nazionale ha organizzato un circuito interlaboratorio, cui hanno aderito sette II.ZZ.SS.

L'obiettivo principale del circuito era volto a monitorare le capacità diagnostiche dei laboratori degli II.ZZ.SS. coinvolti nei programmi di riconoscimento delle aziende di troscultura. In particolare la verifica ha preso in considerazione alcuni degli agenti virali inclusi nell'allegato IV parte II del succitato Dlgs ed altri particolarmente diffusi nel territorio per i quali è comunque necessario disporre di un metodo diagnostico differenziale. In particolare gli agenti virali inclusi nel pannello del 2016 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. Virus della Viremia Primaverile della Carpa (SVCv)

Si è voluto inoltre verificare la sensibilità delle colture cellulari impiegate dai vari laboratori per la ricerca degli agenti virali di cui sopra, valutando il titolo virale ottenuto da ciascun flacone inviato e sottoponendolo ad analisi statistica.

Inoltre nel corso del 2016 si è proceduto ad implementare il sistema di gestione online del circuito tramite la piattaforma AQUAweb. Ai partecipanti è stato richiesto di registrarsi, iscriversi al circuito e inviare i risultati online, parallelamente al sistema cartaceo già in uso. Questa doppia procedura ha avuto lo scopo di garantire il corretto scambio di informazioni a fronte di possibili errori nella comunicazione via web. L'obiettivo è di portare la gestione del circuito esclusivamente tramite la piattaforma AQUAweb a partire dall'anno in corso.

### **Istituti Partecipanti**

Al circuito interlaboratorio hanno partecipato i seguenti Istituti:

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

I sette Istituti che hanno partecipato rappresentano la totalità degli II.ZZ.SS. che, fino ad oggi, espletano attività di controllo ai fini di riconoscimento di aziende ai sensi del Dlgs 148/2008.

## Caratteristiche, composizione e controllo dei campioni

Ad ogni laboratorio sono stati inviati cinque flaconi, in doppio, 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.

**Tabella 1: Contenuto dei flaconi**

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO	N° DI PASSAGGI E LINEA CELLULARE
1	<b>VHSv: F1</b> Jensen M. (1965). "Research on the virus of Egtved diseases" Ann NY Acad Sci 126:422-426	1/16	40° passaggio su EPC
	<b>IHNv: 217/A</b> 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.	1/16	11° passaggio su BF-2
	<b>IPNv: Sp (Spjarup)</b> Jorgensen P.E.V. and Grauballe P.C.(1971) <i>Acta Veterinaria Scandinavica</i> . 12, 145 Jorgensen, P.E.V."A study of viral disease in danish rainbow trout. Their diagnosis and control". 1974 Thesis/dissertation	1/16	21° passaggio su EPC
2	<b>IHNv: 217/A</b> 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.	1/16	11° passaggio su BF-2
3	<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.	2/16	12° passaggio su EPC
4	<b>IPNv: Sp (Spjarup)</b> Jorgensen P.E.V. and Grauballe P.C.(1971) <i>Acta Veterinaria Scandinavica</i> . 12, 145 Jorgensen, P.E.V."A study of viral disease in danish rainbow trout. Their diagnosis and control". 1974 Thesis/dissertation	1/16	21° passaggio su EPC
5	<b>IPNv: Sp (Spjarup)</b> Jorgensen P.E.V. and Grauballe P.C.(1971) <i>Acta Veterinaria Scandinavica</i> . 12, 145 Jorgensen, P.E.V."A study of viral disease in danish rainbow trout. Their diagnosis and control". 1974	1/16	21° passaggio su EPC

	Thesis/dissertation  <b>VHSv: F1</b> Jensen M. (1965). "Research on the virus of Egtved diseaes" Ann NY A cad Sci 126:422-426	1/16	40° passaggio su EPC
--	--	------	----------------------

La sterilità del materiale liofilizzato è stata confermata controllando un flacone di ogni lotto 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.

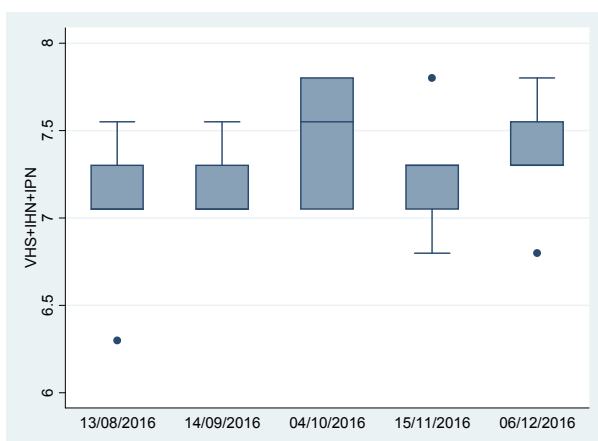
Al fine di verificare l'omogeneità e la stabilità del titolo virale dei ceppi liofilizzati, prima dell'invio ai laboratori aderenti al circuito, sono stati controllati 5 flaconi, per ogni virus oggetto del test, eseguendo, per ognuno di essi, una titolazione su piastra da 96 pozzetti e calcolando il titolo finale secondo la formula di Reed and Muench. Tale procedura è stata ripetuta per 5 volte ad intervalli di circa 1 mese, nel corso del periodo di utilità per l'esecuzione del test per escludere eventuali perdite di titolo significative nel tempo. La procedura di titolazione eseguita per effettuare i controlli di stabilità dei flaconi differisce dalla procedura di esecuzione vera e propria del test interlaboratorio per quanto riguarda la fase di risospensione del liofilo e pertanto i valori di titolo virale ottenuti nella prova di omogeneità e stabilità non sono comparabili con quelli ottenuti dai partecipanti al circuito.

Per verificare se esiste una differenza significativa nella mediana delle distribuzioni dei titoli ottenuti dai falconi testati a diversi istanti temporali, è stato condotto il test non parametrico di Kruskal Wallis (ANOVA non parametrica). Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati significativi.

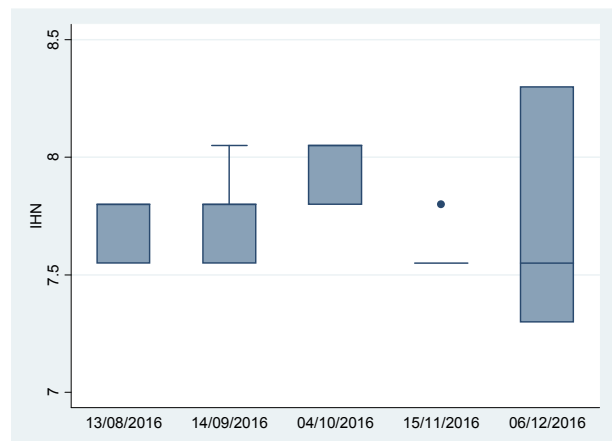
Il test ha indicato che non esiste una differenza tra i vari istanti temporali e quindi il campione si può considerare stabile nel periodo di tempo considerato per i flaconi 1, 2, e 4.

I flaconi 3 e 5 hanno invece evidenziato delle differenze maggiori ( $p < 0.05$ ) tra i vari istanti temporali, differenze che risultano essere mediamente sempre inferiori a un logaritmo rispetto al titolo virale iniziale e quindi possono essere considerate accettabili.

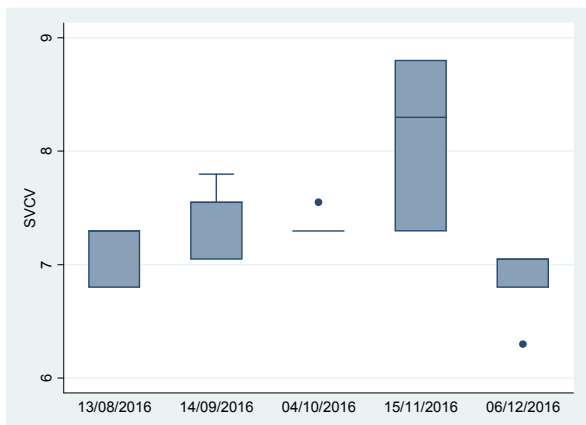
**Figura 1: Andamento del titolo virale dei flaconi liofilizzati (n° 5 flaconi per istante temporale).**



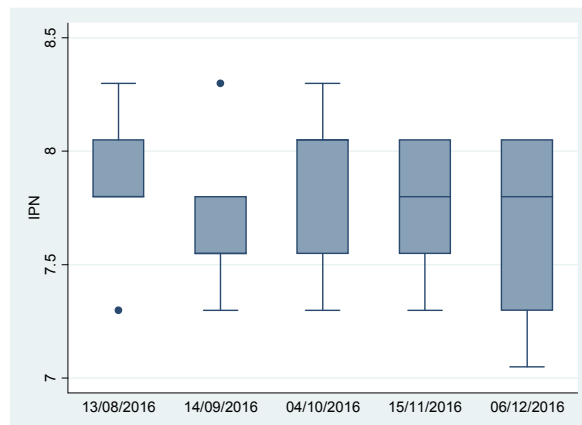
Flacone 1



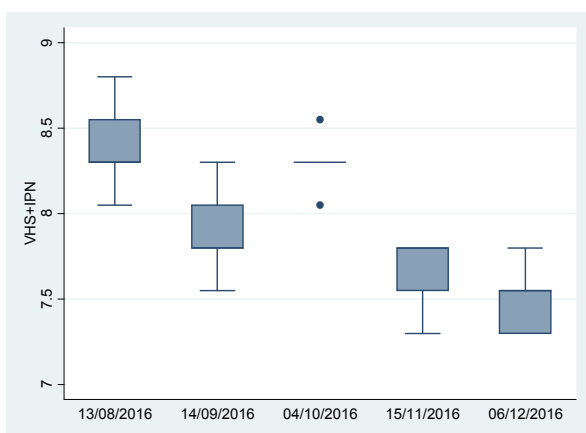
Flacone 2



Flacone 3



Flacone 4



Flacone 5

### Invio e risospensione dei campioni

I flaconi sono stati inviati ad ogni laboratorio partecipante in doppia aliquota. Ogni laboratorio ha ricevuto quindi due serie di flaconi numerati da 1 a 5 per un totale complessivo di 10 flaconi. Al fine di ridurre eventuali perdite di titolo attribuibili ad innalzamenti di temperatura, la spedizione è stata eseguita tramite corriere apposito che ha garantito il mantenimento della refrigerazione dalla spedizione fino alla consegna. Il contenuto di ciascun flacone doveva essere risospeso in 2 ml di terreno colturale addizionato di 10% di siero bovino fetale con aggiunta di Tris o tampone HEPES. I flaconi contrassegnati con lo stesso numero rappresentavano due diverse aliquote dello stesso ceppo virale e il loro contenuto doveva essere unito dopo essere stato risospeso. Il contenuto dei flaconi doveva infine essere filtrato con filtri da 0.45 µm ed utilizzato per la successiva titolazione ed identificazione virale.

La procedura dettagliata contenente le modalità operative da seguire per l'identificazione e la titolazione su cellule è stata inviata unitamente ai campioni.

### Interpretazione dei risultati

Il metodo di valutazione del circuito interlaboratorio prevede che siano assegnati 2 punti per ogni flacone il cui contenuto è stato correttamente identificato, per un totale massimo di 10 punti. Al punteggio raggiunto viene sottratto 1 punto, nel caso di mancata o non corretta identificazione di uno dei due virus o più presenti nelle eventuali infezioni miste, o 2 punti nel caso di non corretta

identificazione dei virus presenti nei flaconi con infezioni miste o del virus presente in singolo nei flaconi.

Per quanto riguarda la valutazione della sensibilità delle cellule si ritiene che il dato non debba essere soggetto a valutazione ma servire esclusivamente a monitorare l'efficacia del metodo colturale in uso e suggerire, dove eventualmente siano presenti problemi di perdita di sensibilità, la sostituzione delle cellule impiegate con altri cloni di adeguata sensibilità.

Per assicurare l'anonimato dei risultati, ad ogni laboratorio è stato assegnato un codice numerico compreso tra 1-7. Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e relativo valore punteggio ottenuto.

## **Risultati**

Tutti gli II.ZZ.SS. coinvolti in indagini di laboratorio nell'ambito del Dlgs 148/2008 hanno preso parte al circuito.

Nel corso dell'invio del pannello AQUA-IV 2016 si sono riscontrati alcuni problemi in fase di spedizione in quanto i campioni sono pervenuti ad un IZS a temperatura ambiente, e ad un altro IZS in una sede diversa da quella del laboratorio esecutore. Pertanto è stato necessario inviare un nuovo pannello ai due dei laboratori interessati dal problema (Lab 1 e 5). Questo ha comportato dei ritardi in fase di avvio del circuito nonché nella chiusura dello stesso. E' stato infatti inevitabile l'estensione del termine per la consegna dei risultati, programmata inizialmente per il 02/12/2016, al 23/12/2016.

Un laboratorio (Lab. 1) ha richiesto inoltre l'invio da parte del CDR di colture cellulari (EPC e BF-2) da sostituire a quelle in uso nel laboratorio.

## **Risultati identificazione virale**

Quattro laboratori su 7 partecipanti hanno identificato correttamente il contenuto di tutti i flaconi totalizzando quindi il punteggio massimo.

Per quanto riguarda l'identificazione dei virus notificabili ai sensi del Dlgs 148/2008: VHSV e IHNv contenuti nei flaconi n° 2 e 5, questi sono stati correttamente identificati da tutti i laboratori. Al contrario 3 laboratori su 7 non hanno identificato uno degli agenti presenti nel flacone 1 (1 per IHN e 2 per VHS). E' da sottolineare che il flacone 1 presentava una triplice infezione (VHS, IHN e IPN) e pertanto un coefficiente di difficoltà particolarmente elevato.

I virus SVCv e IPNv, contenuti rispettivamente nei flaconi n° 3 e 4, sono stati identificati e caratterizzati correttamente dalla totalità dei laboratori.

Nel flacone n° 5, due laboratori su 7 non sono riusciti ad identificare correttamente la presenza di IPN in coinfezione con VHS.

Infine 1 laboratorio ha identificato la presenza di virus IPN anche nel flacone 2 dove esso in realtà non era presente.

**Tabella 2: Risultati e punteggio complessivo dei diversi laboratori partecipanti al test interlaboratorio AQUA-IV 2016**

CODICE LABORATORIO							
N. FLACONE E CONTENUTO	1	2	3	4	5	6	7
<b>1</b> IHNv + VHSv + IPNv	VHSv + IPNv	IHNv + VHSv + IPNv	IHNv + IPNv	IHNv + IPNv	IHNv + VHSv + IPNv	IHNv + VHSv + IPNv	IHNv + VHSv + IPNv
<b>2</b> IHNv	IHNv + IPNv	IHNv	IHNv	IHNv	IHNv	IHNv	IHNv
<b>3</b> SVCv	SVCv	SVCv	SVCv	SVCv	SVCv	SVCv	SVCv
<b>4</b> IPNv	IPNv	IPNv	IPNv	IPNv	IPNv	IPNv	IPNv
<b>5</b> VHSv + IPNv	VHSv	VHSv + IPNv	VHSv + IPNv	VHSv	VHSv + IPNv	VHSv + IPNv	VHSv + IPNv
<b>Punteggio ottenuto</b>	<b>8/10</b>	<b>10/10</b>	<b>9/10</b>	<b>8/10</b>	<b>10/10</b>	<b>10/10</b>	<b>10/10</b>

**Tabella 3: Titolo virale 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.**

	Laboratorio	1	2	3	4	5	6	7
N° flacone	Linea cellulare	Titolo Virale (TCID <sub>50</sub> /25µl)						
<b>1</b>	EPC	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2,75</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1,4</sup>	10 <sup>2,5</sup>	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>2</sup>
	BF-2	10 <sup>4,75</sup>	10 <sup>3,6</sup>	10 <sup>3,6</sup>	10 <sup>1,6</sup>	10 <sup>2,6</sup>	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>2,6</sup>
<b>2</b>	EPC	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3,12</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4,46</sup>	10 <sup>2,76</sup>
	BF-2	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4,75</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4,45</sup>	10 <sup>3,15</sup>	10 <sup>3,38</sup>
<b>3</b>	EPC	10 <sup>5,6</sup>	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>4,75</sup>	10 <sup>5,3</sup>	10 <sup>5,15</sup>	10 <sup>4,74</sup>	10 <sup>3,36</sup>
	BF-2	10 <sup>4,64</sup>	10 <sup>4,25</sup>	10 <sup>4,6</sup>	10 <sup>5,4</sup>	10 <sup>4,69</sup>	10 <sup>4,6</sup>	10 <sup>3,75</sup>
<b>4</b>	EPC	10 <sup>5,37</sup>	10 <sup>4,75</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5,25</sup>	10 <sup>4,5</sup>
	BF-2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5,36</sup>	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>4,75</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>4,75</sup>
<b>5</b>	EPC	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3,4</sup>	10 <sup>5,25</sup>	10 <sup>3,25</sup>	10 <sup>3,6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2,5</sup>
	BF-2	10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>4,25</sup>	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>3,25</sup>



**Tabella 4: Descrizione delle caratteristiche dei titoli virali ottenuti (espressi come valore dell'esponente) dai diversi partecipanti al circuito.**

Linea cellulare in esame	EPC				
N° laboratory partecipanti	7				
Flacone n°	1	2	3	4	5
Median titre	2,75	4	4,75	5	3,6
Maximum titre	5	5,5	5,6	5,37	5,25
Minimum titre	1,4	2,76	3,36	4	2,5
25% quartile titre	2,25	3,06	4,12	4,625	3,325
75% quartile titre	4,25	4,82	5,225	5,125	4,5

Linea cellulare in esame	BF-2				
N° laboratory partecipanti	7				
1	2	3	4	5	
Median titre	3,6	3,38	4,6	5,36	4,25
Maximum titre	4,75	4,75	5,4	5,75	5,5
Minimum titre	1,6	3	3,75	4	3,25
25% quartile titre	2,6	3,075	4,425	4,75	3,5
75% quartile titre	4,05	4,5	4,665	5,45	4,75

### **Sensibilità delle colture cellulari**

La sensibilità delle cellule impiegate è stata misurata in funzione del titolo virale di crescita evidenziato in coltura per ciascun virus identificato confrontato con quello ottenuto dal laboratorio gold standard (Centro di Referenza).

Nella tabella successiva sono riportate le informazioni ricevute relativamente alle cellule impiegate da ciascun laboratorio. In particolare, ai fini della valutazione della sensibilità cellulare, si ritiene interessante conoscere la provenienza della linea cellulare, il numero di sub-colture eseguite e il terreno ed eventuali supplementi utilizzati per la crescita.

**Tabella 5: Principali informazioni relative alle cellule utilizzate dai partecipanti al circuito**

Codice Lab.	Linea cellulare	Origine	N° Passaggio	Terreno colturale	Supplementi
1	EPC	IZSVE	122°	MEM EARLE'S W/L-GLUT	10% FBS 5% ANTIBIOTICI
	BF-2	IZSVE	126°		
2	EPC	/	27°	MEM EAGLE EARLE'S SALTS BASE	10% SFB
	BF-2	/	124°		
3	EPC	IZSVE	229.13.95	MEM EARLE	10% SFB Antibiotici (Streptomicina +Penicillina) L-glutamina
	BF-2	IZSVE	384.40.130		
4	EPC	IZSVE	229.125.3°	MEM (Gibco)	10% SFB 1% AA (Gibco)
	BF-2	IZSVE	384.160.3°		
5	EPC	IZSVE	(320.2.4) 326	E-M EM Sigma	10% FBS 1% PSF Tris HCl 1N 1% L-glutamina
	BF-2	IZSVE	(123.3.21.5.4) 156		
6	EPC	IZSVE	229.13.117	E-MEM Sigma	10% SBF 1% L-glutamina 1,6% Tris-HCl 1N 1% Antibiotici
	BF-2	IZSVE	384.40.119		
7	EPC	IZSVE	270°	MEM (Sigma)	10% SFB (Sigma) 0,8% Tris-HCl 2M (Sigma) 1% MEM NEAA
	BF-2	IZSLER	125°		

**Risultati sensibilità cellulare**

I risultati dettagliati della sensibilità cellulare osservati per i diversi laboratori partecipanti al laboratorio sono riportati nelle tabelle e nei grafici sottostanti.

In questo circuito alcuni laboratori risultano essere significativamente diversi dal laboratorio gold standard (Centro di Referenza) nella determinazione dei quantitativi di virus presenti nei flaconi del circuito.

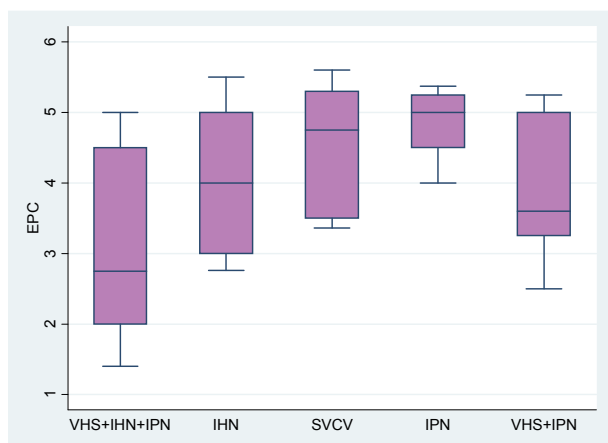
In particolar modo, il laboratorio n° 2 ha mostrato una sensibilità inferiore rispetto al laboratorio di riferimento, anche se questo non ha influenzato la capacità diagnostica del laboratorio che di fatto ha ottenuto il punteggio massimo. Anche il laboratorio 5 (per la sola linea cellulare EPC) ed il laboratorio 7 (per la sola linea cellulare BF-2) hanno evidenziato una leggera riduzione della sensibilità cellulare.

Infine va segnalato che il laboratorio 4, anche se non evidente dal confronto a coppie, mostra una elevata dispersione del dato dovuta presumibilmente a una incostanza delle prestazioni delle linee cellulari in uso (Figure 3 e 5), che si consiglia quindi di tenere monitorate.

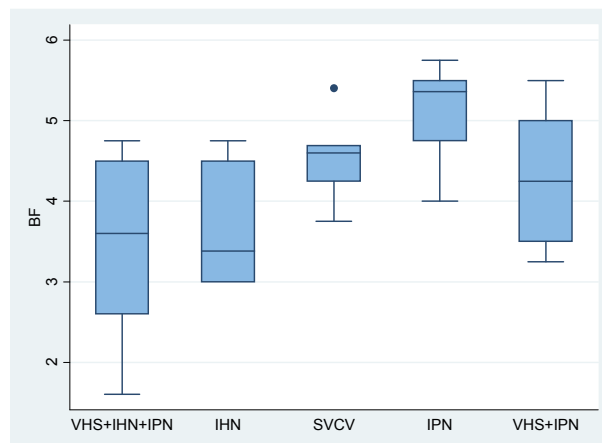
**Tabella 6: Confronto tra sensibilità cellulare dei singoli laboratori ed il gold standard**

Laboratorio	Linea cellulare	P value	Differenza significativa
Lab 1	BF	0.8927	NO
Lab 1	EPC	0.4982	NO
Lab 2	BF	0.0431	SI
Lab 2	EPC	0.0431	SI
Lab 3	BF	0.5862	NO
Lab 3	EPC	1.0000	NO
Lab 4	BF	0.1380	NO
Lab 4	EPC	0.1380	NO
Lab 5	BF	0.3452	NO
Lab 5	EPC	0.0796	NO (al limite, significativa al 10%)
Lab 7	BF	0.0796	NO (al limite, significativa al 10%)
Lab 7	EPC	0.0422	SI

**Figura 2: Sensibilità complessiva dei substrati cellulari di BF-2 ed EPC nei confronti dei virus contenuti nei flaconi**

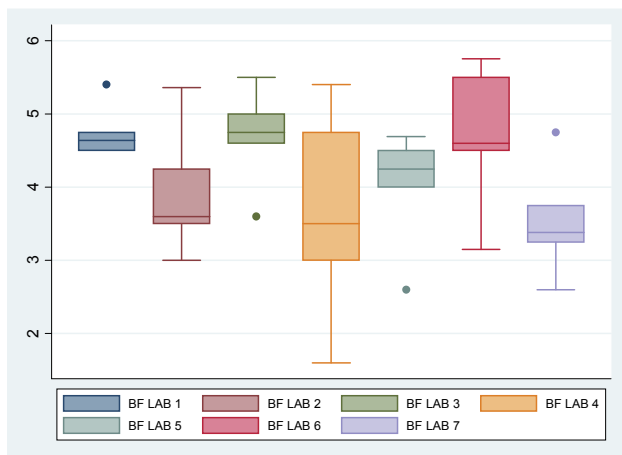


Linea cellulare EPC

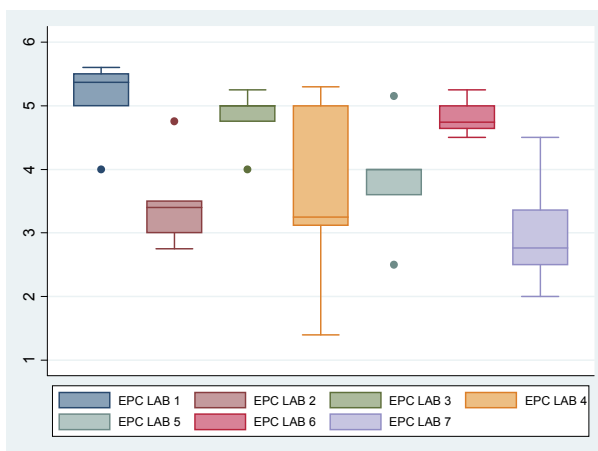


Linea cellulare BF-2

**Figura 2: Sensibilità complessiva dei substrati cellulari di BF-2 ed EPC utilizzati dai diversi laboratori**

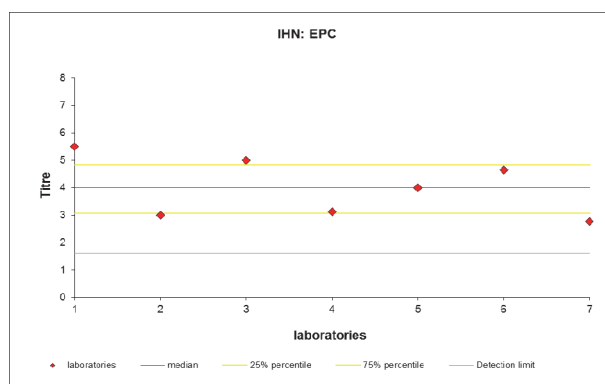
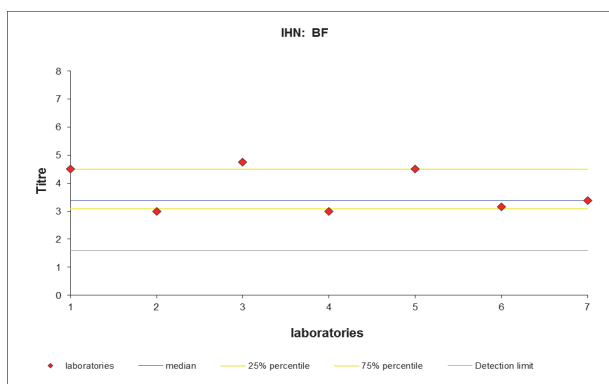
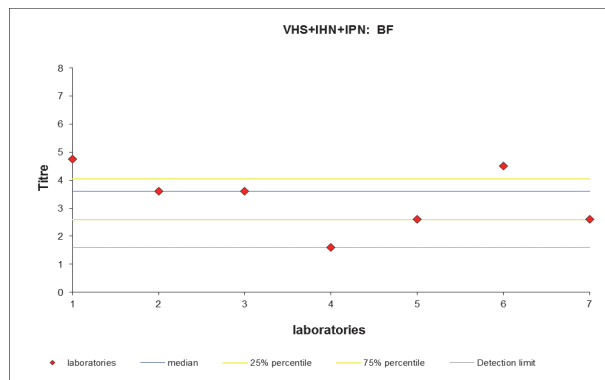
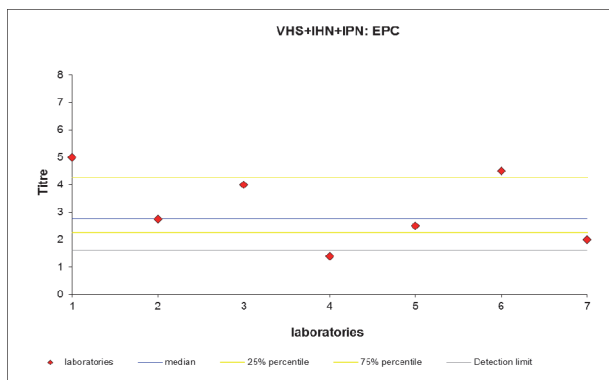


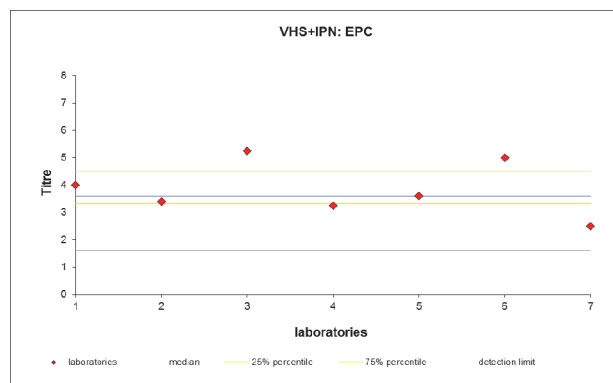
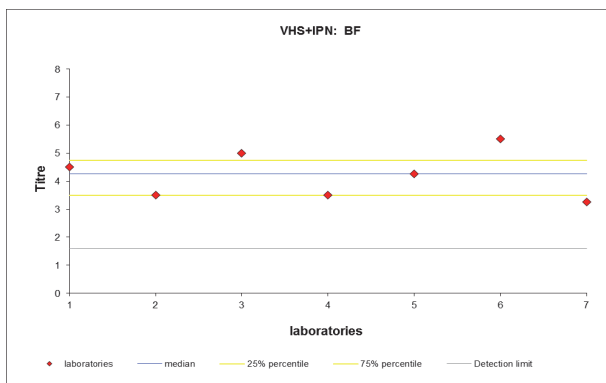
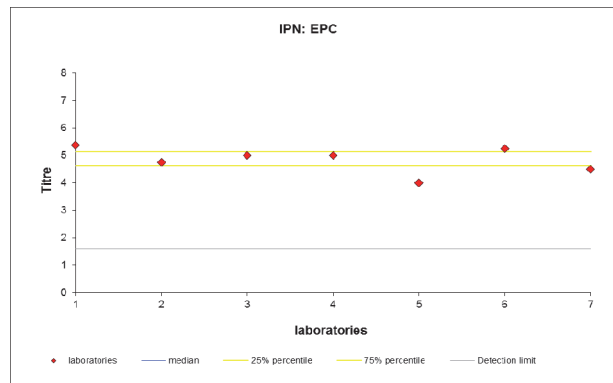
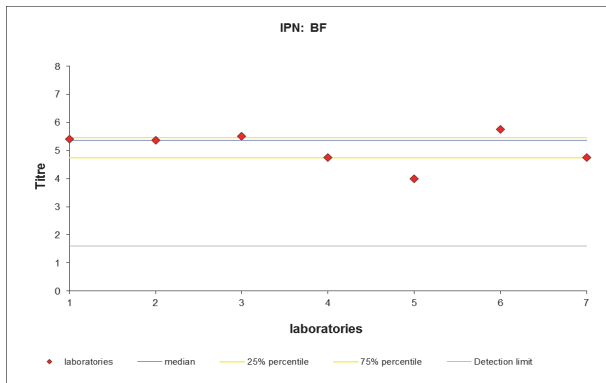
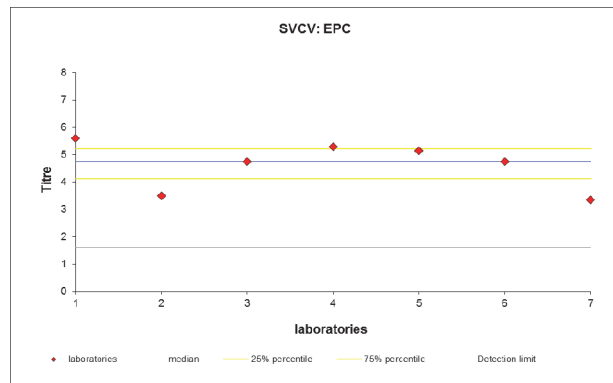
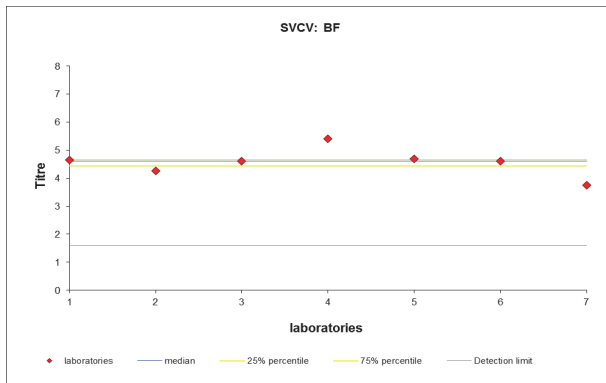
Linea cellulare EPC



Linea cellulare BF-2

**Figura 3: Confronto tra sensibilità cellulare dei singoli laboratori ed il gold standard**





## Conclusioni

I risultati ottenuti nel corso del XV° circuito annuale interlaboratorio AQUA-IV 2016 consentono di affermare che i laboratori degli II.ZZ.SS. coinvolti nel controllo delle aziende ittiche riconosciute ai sensi del Dlgs 148/2008, possiedono una buona capacità diagnostica. Infatti, sul totale dei campioni inclusi nel circuito annuale (n= 56), ne sono stati isolati e identificati correttamente il 91% (n=51). Il risultato complessivo del circuito può essere pertanto ritenuto positivo.

I principali problemi riscontrati durante questi circuiti hanno riguardato la spedizione dei campioni che pertanto dovrà essere più attentamente monitorata in futuro. Infine è da segnalare che non si sono rilevati particolari problemi con l'inserimento dei risultati on-line sul portale AQUAweb di recente implementazione (relativamente a questo circuito).

I risultati qui presentati verranno discussi durante la consueta riunione di aggiornamento degli II.ZZ.SS. organizzata dal Centro di Referenza nei giorni 20-21 Aprile p.v.

Data report definitivo 10/04/2017

Responsabile circuito interlaboratorio  
Dr.ssa Anna Toffan

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