



00139

PROFICIENCY TESTING AQUA IV

Virologia organismi acquatici

Report	Finale – ri-emissione
Schema	AQUA IV 1-25 AQUA IV 2-25
Anno di erogazione	2025
Periodo di esecuzione	20/10/2025 – 23/12/2025
Data emissione	12/03/2026
Data ri-emissione	23/04/2026
ID report	AQIV-25FR

ORGANIZZATORE	Centro di Referenza Nazionale (CRN) per le malattie dei pesci Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) Viale dell'Università 10 Legnaro (Padova) - Italia www.izsvenezie.it
RESPONSABILE PT	Anna Toffan atoffan@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084333
RESPONSABILE TECNICO	Alessandra Buratin aburatin@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084388
RESPONSABILE STATISTICO	Marzia Mancin mmancin@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084431
SEGRETERIA	Paola Mozzi pmozzi@izsvenezie.it Tel. +39 049 8084369-371

Riservatezza

Nel presente documento i risultati di ogni laboratorio partecipante sono identificati da un codice alfanumerico che è stato assegnato a ciascuno di essi al momento della registrazione e che consente di riportare i risultati senza rivelare l'identità dei partecipanti.

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

NOTA:

Il presente report annulla e sostituisce il report finale precedentemente pubblicato.

Si modifica in tabella 6 per il laboratorio L000438 la sottolineatura in rosso dell'esito del flacone 3, erroneamente evidenziato come errato, al posto del flacone 2. Le parti modificate sono evidenziate in giallo.

Layout report: IZS MOD 501 IV – rev 06 – 01/26 - Report AQUA IV

Sommario

Introduzione	4
1. Materiali e Metodi	4
1.1 Proprietà e composizione dei campioni	4
1.1.1 Schema IV 1	4
1.1.2 Schema IV 2	5
1.2 Valore assegnato	6
1.3 Controlli qualità	6
1.4 Distribuzione	9
1.5 Analisi dei campioni	9
1.6 Comunicazione dei risultati	9
1.7 Valutazione dei risultati	10
1.7.1 Schema AQUA IV 1 e AQUA IV 2	10
2. Risultati	11
2.1 Schema AQUA IV 1	11
2.2 Schema AQUA IV 2	13
3. Discussioni e conclusioni del PT	15
3.1 Schema AQUA IV 1	15
3.2 Schema AQUA IV 2	15
3.3 Conclusioni generali	15
Bibliografia	16
APPENDICE I*	17
Schema AQUA IV 1	18
I.1 Commenti generali sulla sensibilità delle colture cellulari utilizzate dai partecipanti	18
I.2 Risultati della sensibilità delle colture cellulari	18
I.3 Ulteriori indicazioni sulla sensibilità delle colture cellulari dei partecipanti rispetto ad una variabilità prefissata	21

Introduzione

In ottemperanza a quanto previsto dall'art. 2 del Decreto 4 ottobre 1999, del Ministero della Sanità, il Centro di Referenza Nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei, ha organizzato un PT con l'obiettivo di monitorare le capacità diagnostiche dei laboratori di ittiovirologia degli II.ZZ.SS.. In particolare gli agenti virali da identificare inclusi nel pannello 2025 sono stati i seguenti:

1. Virus della Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHNV)
2. Virus della Setticemia 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 PT è formato da due schemi:

- IV 1-25 "Isolamento ed identificazione degli agenti virali dei pesci (Virus della Setticemia emorragica virale – VHSV, Virus della Necrosi ematopoietica infettiva – IHNV, virus della Necrosi pancreatica infettiva - IPNV, Virus della Viremia primaverile della carpa – SVCV)";
- IV 2-25 "Rilevazione del DNA dell'Herpesvirus della carpa Koi (CyHV-3)".

Entrambi gli schemi sono di tipo qualitativo.

Sei (6) laboratori hanno aderito all'edizione 2025 del PT. I campioni sono stati spediti il 14/10/2025 per garantire che tutti i partecipanti ricevessero i campioni in tempo per iniziare l'esercizio. Nessuna anomalia rispetto a contenuto e condizione dei campioni è stata segnalata dai partecipanti.

L'esercizio si è svolto dal 20/10/2025 al 23/12/2025, data di scadenza per la presentazione dei risultati.

In data 13/01/2026 è stato pubblicato in Aquaweb il report preliminare contenente la composizione dei campioni e i valori assegnati.

1. Materiali e Metodi

1.1 Proprietà e composizione dei campioni

Quando possibile, i campioni rispecchiavano la natura dei campioni di routine. La procedura per la ricostituzione del liofilo e per l'esecuzione delle prove di isolamento, titolazione virale e biologia molecolare è dettagliata nel documento "Modalità operative AQUA IV" disponibile nella piattaforma Aquaweb.

1.1.1 Schema IV 1

Ad ogni laboratorio sono stati inviati cinque (5) campioni, in doppia aliquota, descritti in Tabella 1.

Tabella 1. Composizione dello schema AQUA IV 1

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO	N° DI PASSAGGI E LINEA CELLULARE
1	VHSV VHSV/O.mykiss/I/TN/80/Mar10 Pascoli F. et al. (2015) Susceptibility of genotyped marble trout <i>Salmo marmoratus</i> strains to experimental challenge with European VHSV and IHNV. <i>Aquaculture</i> , 435: 152-156.	Lotto 1/19	2° EPC

2	SVCV 415-1/ITT08 Isolato da <i>Cyprinus carpio</i> malate in ottobre 2008. Caratterizzato nell'ambito del progetto Europea EVA Global (Ref-SKU: 025V-06167)	Lotto 2/24	2° su EPC
3	Coinfezione IHNV + IPNV IHN DK 21-4070 Danish Isolate from 12nd May 2021 Kindly provided from EURLFISH (DTU-AQUA, Copenhagen) IPNV (Sp serotype; genotype V) 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 1/23	5° su EPC 1° su EPC
4	IHNV IHNV/O.mykiss/I/VI/409/Nov06 Pascoli F. et al. (2015) Susceptibility of genotyped marble trout <i>Salmo marmoratus</i> strains to experimental challenge with European VHSV and IHNV.	Lotto 1/17	2° su EPC
5	NEGATIVO Minimum Essential Medium (MEM)	Lotto 2/22	Prodotto commerciale

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.

1.1.2 Schema IV 2

Ad ogni laboratorio sono stati inviati cinque (5) campioni, in singola aliquota, descritti in Tabella 2.

Tabella 2. Composizione dello schema AQUA IV 2

FLACONE	VIRUS RIFERIMENTO	LOTTO
1	NEGATIVO Minimum Essential Medium (MEM)	Lotto 1/22
2	KHV 197-6/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</i> koi) 126, EAAP Bulletin, 33(4) 2013	Lotto 2/22
3	KHV 197-6/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</i> koi) 126, EAAP Bulletin, 33(4) 2013	Lotto 1/23

4	KHV 197-6/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</i> <i>koi</i>) 126, EAAP Bulletin, 33(4) 2013	Lotto 2/23
5	NEGATIVO Minimum Essential Medium (MEM)	Lotto 1/22

1.2 Valore assegnato

Il valore assegnato coincide con il valore atteso che è stato determinato utilizzando procedure analitiche raccomandate che garantiscono l'accuratezza e la precisione dei risultati. Questi metodi sono elencati nella Tabella 5.

Per i PT qualitativi 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 PT.

1.3 Controlli qualità

Il controllo qualità è stato eseguito in conformità alle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2024 e UNI ISO 13528:2022, utilizzando i metodi contrassegnati dal simbolo † in Tabella 5.

La titolazione viene effettuata su cinque (5) flaconi. L'organizzatore del PT 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.

L'identificazione del virus oggetto di valutazione nel PT, 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 PT. 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 PT e alla fine del periodo di analisi del PT, su cinque (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 PT 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 PT 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 PT.

Figura 1: Andamento medio del titolo virale dei flaconi liofilizzati (n° 5 flaconi per istante temporale) nelle due linee cellulari utilizzate

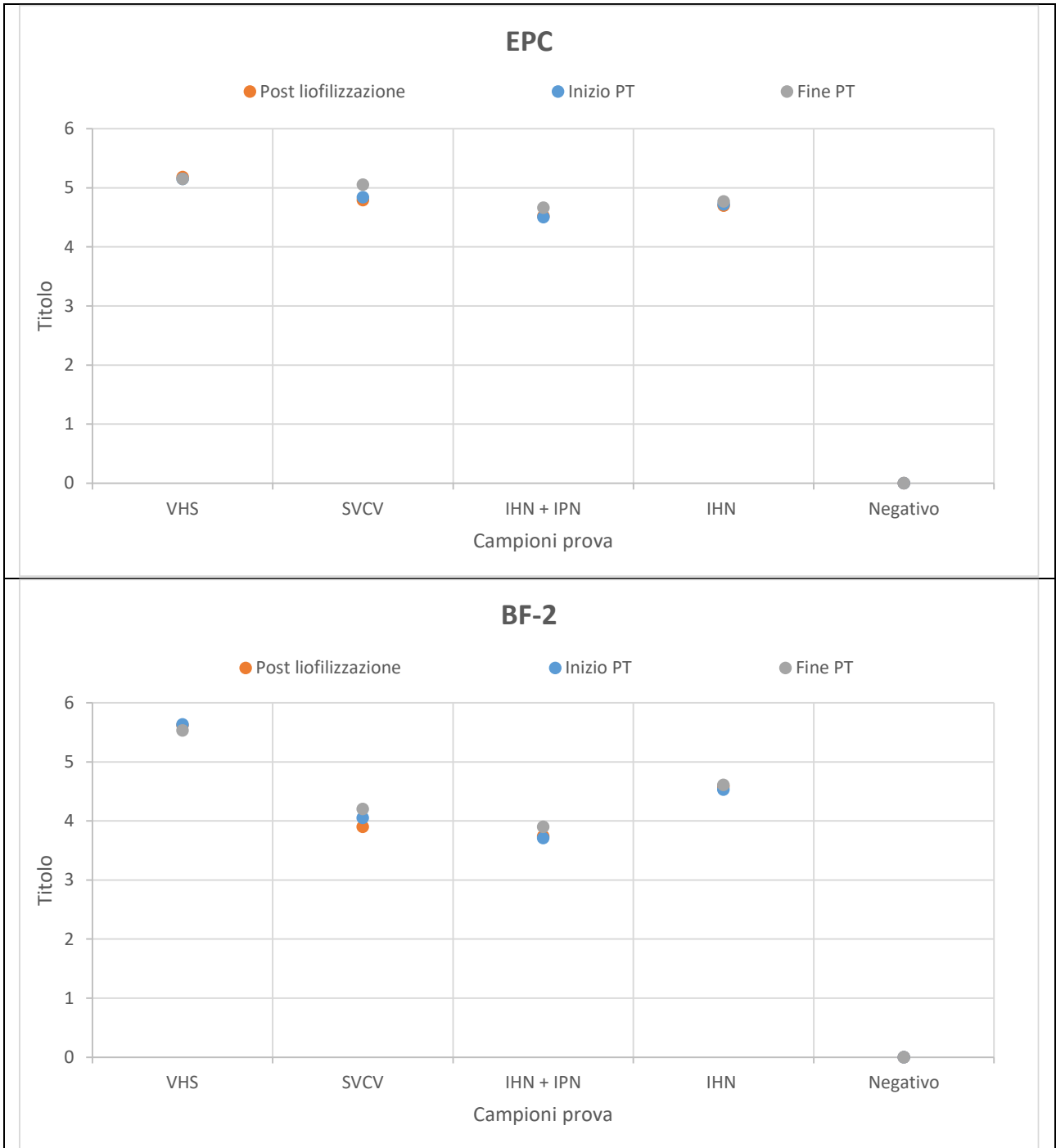


Tabella 3: statistica descrittiva dei valori delle titolazioni per virus e linea cellulare

EPC							
Momento di osservazione	data	Statistica	VHS	SVCV	IHN + IPN	IHN	Negativo
POST LIOFILIZZAZIONE	19/08/2025	Media 5 osservazioni	5,18	4,79	4,52	4,70	0,00
		Deviazione standard	0,25	0,27	0,08	0,19	0,00
		Incertezza	0,11	0,12	0,04	0,09	0,00
INIZIO PT	06/10/2025	Media 5 osservazioni	5,15	4,84	4,50	4,72	0,00
		Deviazione standard	0,14	0,28	0,07	0,19	0,00
		Incertezza	0,06	0,13	0,03	0,08	0,00
FINE PT	19/12/2025	Media 5 osservazioni	5,15	5,05	4,66	4,77	0,00
		Deviazione standard	0,14	0,21	0,08	0,23	0,00
		Incertezza	0,06	0,09	0,04	0,10	0,00
BF-2							
Momento di osservazione	data	Statistica	VHS	SVCV	IHN + IPN	IHN	Negativo
POST LIOFILIZZAZIONE	19/08/2025	Media 5 osservazioni	5,62	3,90	3,74	4,58	0,00
		Deviazione standard	0,14	0,22	0,16	0,16	0,00
		Incertezza	0,06	0,10	0,07	0,07	0,00
INIZIO PT	06/10/2025	Media 5 osservazioni	5,63	4,05	3,71	4,53	0,00
		Deviazione standard	0,17	0,21	0,17	0,15	0,00

		Incertezza	0,08	0,09	0,08	0,07	0,00
--	--	------------	------	------	------	------	------

FINE PT	19/12/2025	Media 5 osservazioni	5,53	4,20	3,90	4,61	0,00
		Deviazione standard	0,15	0,11	0,14	0,09	0,00
		Incertezza	0,07	0,05	0,06	0,04	0,00

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 PT.

Tabella 4: 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 PT per ogni virus e linea cellulare

	Flacone 1 VHS	Flacone 2 SVCV	Flacone 3 IHN + IPN	Flacone 4 IHN	Flacone 5 Negativo
EPC	0,00	0,21	0,16	0,05	0,00
BF-2	0,10	0,15	0,19	0,08	0,00

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

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

1.4 Distribuzione

I campioni sono stati adeguatamente imballati e spediti in condizioni tali da mantenere la stabilità del materiale in essi contenuto durante il trasporto. I campioni sono stati identificati con un codice alfanumerico e dovevano essere utilizzati solo per gli scopi del PT.

1.5 Analisi dei campioni

I partecipanti sono stati invitati a testare i campioni utilizzando i loro metodi analitici di routine, purché conformi a quelli definiti dall'organizzatore. I dati inerenti la valutazione delle linee cellulari sono presentati sotto forma di appendice al presente report (APPENDICE I)

1.6 Comunicazione dei risultati

I risultati sono stati trasmessi attraverso il portale Aquaweb. Per essere conformi, i risultati dovevano essere consegnati entro il termine stabilito.

1.7 Valutazione dei risultati

1.7.1 Schema AQUA IV 1 e AQUA IV 2

In accordo a quanto indicato nella UNI ISO 13528:2022, in presenza di un PT qualitativo, la valutazione della performance viene effettuata attribuendo dei punteggi alle risposte dei partecipanti in relazione al valore assegnato.

Il metodo di valutazione del PT 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 PT AQUA IV se la somma dei punteggi è superiore/uguale a 8 punti su 10.

Tabella 5. Metodi usati per assegnare i valori target ai campioni e la conformità alle prove di omogeneità e stabilità (identificati dal simbolo †).

Schema	Misurando	Metodo
AQUA IV 1	Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHNv) e Setticemia Emorragica Virale (VHSv)	DTU EURL AQUA FISH VHS-IHN Vers. 2 2021 †
	Necrosi Pancreatica Infettiva (IPNv)	Ricerca del virus della necrosi pancreatica infettiva NPI/IPN mediante isolamento in colture cellulari e identificazione in immunofluorescenza (PDP ITT 013 2024 rev. 09) †
	Viremia Primaverile della Carpa (SVCv)	WOAH Manual for Aquatic Animals Cap. 2.3.9 par. 4.3 e 4.9.2 2023 †
AQUA IV 2	Herpes virus della Carpa Koi (KHV)	Rilevazione dell'Herpes virus della Carpa Koi (KHV) mediante real time PCR (PDP ITT 101 2022 rev. 04) †

† Metodo applicato per la verifica del grado di omogeneità e stabilità dei campioni, nonché del valore assegnato

2. Risultati

2.1 Schema AQUA IV 1

Cinque (5) su sei (6) laboratori partecipanti allo schema hanno identificato correttamente il contenuto di tutti i flaconi totalizzando quindi il punteggio massimo di 10.

In Tabella 6 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

Tabella 6. Risultati e punteggio complessivo dei diversi laboratori partecipanti allo schema AQUA IV 1

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	Flacone	ELISA	IF	Identificazione in IF	RT-PCR	Identificazione in RT-PCR	Punteggio ottenuto
L000410	15/10/2025	20/11/2025	Flacone 1	NE	P	VHS	NE		10
			Flacone 2	NE	P	SVCV	NE		
			Flacone 3	NE	P	IHN+IPN	NE		
			Flacone 4	NE	P	IHN	NE		
			Flacone 5	NE	N		NE		
L000417	15/10/2025	15/12/2025	Flacone 1	NE	NE		P	VHS	10
			Flacone 2	NE	NE		P	SVC	
			Flacone 3	NE	NE		P	IPN+IHN	
			Flacone 4	NE	NE		P	IHN	
			Flacone 5	NE	NE		N		
L000438	22/10/2025	31/10/2025	Flacone 1	NE	P	VHS	P	VHS	7
			Flacone 2	NE	P	VHS-SVCV	P	VHS	
			Flacone 3	NE	P	IHN+IPN	P	IHN	
			Flacone 4	NE	P	IHN	P	IHN	
			Flacone 5	NE	N		N		
L000456	15/10/2025	07/11/2025	Flacone 1	NE	P	VHS	P	VHS	10
			Flacone 2	NE	P	SVC	P	SVC	
			Flacone 3	NE	P	IHN+IPN	P	IHN+IPN	
			Flacone 4	NE	P	IHN	P	IHN	
			Flacone 5	NE	N		N		
L000682	17/10/2025	13/11/2025	Flacone 1	NE	P	VHS	P	VHS	10
			Flacone 2	NE	P	SVCV	P	SVCV	
			Flacone 3	NE	P	IHN+IPN	P	IHN+IPN	
			Flacone 4	NE	P	IHN	P	IHN	
			Flacone 5	NE	N		N		
L000951	15/10/2025	03/11/2025	Flacone 1	NE	NE		P	VHS	10
			Flacone 2	NE	NE		P	SVCV	
			Flacone 3	NE	NE		P	IHN+IPN	
			Flacone 4	NE	NE		P	IHN	
			Flacone 5	NE	NE		N		

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

2.2 Schema AQUA IV 2

Cinque (5) su cinque (5) laboratori partecipanti allo schema hanno identificato il contenuto totalizzando quindi il punteggio di 10.

In Tabella 7 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

Tabella 7. Risultati e punteggio complessivo dei laboratori partecipanti allo schema AQUA IV 2

Codice laboratorio	Data ricevimento flaconi	Data inizio analisi	metodo d'analisi	Flacone	esito	Ct (se presente)	Punteggio ottenuto
L000410	09/12/2025	10/12/2025	End Point - manuale OIE	1	N		10
				2	P		
				3	P		
				4	P		
				5	N		
L000417	11/12/2025	12/12/2025	Protocollo CNR-IZSVe	1	N		10
				2	P	33,53	
				3	P	34,5	
				4	P	35	
				5	N		
L000438	03/11/2025	06/11/2025	Real Time RT- PCR - EURL for Fish and Crustacean Diseases Par III.1 V2023.1	1	N		10
				2	P	29	
				3	P	29	
				4	P	34	
				5	N		
L000682	06/11/2025	10/11/2025	End Point PCR - Bercovier et al., 2005	1	N		10
				2	P		
				3	P		
				4	P		
				5	N		
L000951	15/11/2025	19/11/2025	Gilad et al., 2004, Disease of Acquatic Organism; Vol.60; pp:179-187. Protocollo: real time PCR	1	N	>40	10
				2	P	31,79	
				3	P	32,45	
				4	P	34,13	
				5	N	>40	

Legenda: i risultati errati vengono segnati in rosso

3. Discussioni e conclusioni del PT

3.1 Schema AQUA IV 1

Cinque (5) 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 L000438 non ha identificato uno dei due virus (IPN) presenti nella coinfezione (campione prova n° 3) ed ha identificato un virus aggiuntivo (VHS) nel campione prova n° 2 probabilmente contaminandolo con il contenuto di un altro flacone. Questi errori hanno causato una penalizzazione di 3 punti, facendo ottenere a questo laboratorio un punteggio di 7/10. La prestazione del laboratorio L000438 non è quindi considerata accettabile secondo i criteri definiti dal presente PT.

In Tabella 6 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

3.2 Schema AQUA IV 2

Cinque (5) laboratori su cinque (5) hanno individuato il virus contenuto nei campioni prova ottenendo il massimo punteggio.

In Tabella 7 sono riportati i risultati ottenuti dai singoli laboratori, relativamente all'identificazione del contenuto dei singoli flaconi e il punteggio totale ottenuto.

3.3 Conclusioni generali

Nel presente report sono riportati i risultati del PT AQUA IV 2025 organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei pesci.

I risultati del PT AQUA IV 2025 sono stati buoni in quanto solo un partecipante, e solo relativamente allo schema AQUA IV 1, non ha ottenuto un punteggio accettabile.

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 PT per il mantenimento della qualità dei risultati dei laboratori.

Il CRN si rende disponibile ad offrire un servizio di follow-up ai partecipanti che ne facessero richiesta allo scopo di individuare la causa di eventuali errori o discrepanze, mettere in atto le necessarie misure correttive e garantire adeguato supporto per l'implementazione dei test diagnostici raccomandati dal Centro di Referenza Nazionale presso i propri laboratori.



Dr.ssa Anna Toffan

Responsabile Proficiency Testing AQUA IV

Data report finale **ri-emissione: 23/04/2026**

Bibliografia

European Reference Laboratory for fish and crustacean diseases: Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of infection with VHSV and IHNV v2021.2 available at <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals>

European Reference Laboratory for fish and crustacean diseases: Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of Koi Herpes Virus Disease (KHVD) v2023.1 <https://www.eurl-fish-crustacean.eu/-/media/sites/eurl-fish-crustacean/fish/diagnostic-manuals/khv/khv-diagnostic-manual-2024.pdf>

WOAH, Manual for Aquatic Animals, Cap. 2.3.9, par. 4.3, 4.9.2, 2023 - Infection with spring viraemia of carp virus

UNI ISO 13528:2022 Metodi statistici utilizzati nelle prove valutative mediante confronti interlaboratorio

UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2024 Valutazione della conformità – Requisiti generali per la competenza dei provider di prove valutative interlaboratorio

APPENDICE I*

Schema AQUA IV 1	18
------------------------	----

* I risultati e i dati riportati nella presente appendice non sono oggetto di accreditamento ACCREDIA. Sono raccolti ed elaborati esclusivamente a scopo informativo e per l'autovalutazione da parte dei partecipanti. In alcuni casi, possono aiutare nell'interpretazione dei risultati.

Schema AQUA IV 1

I.1 Commenti generali sulla sensibilità delle colture cellulari utilizzate dai partecipanti

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

I.2 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 I1. 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	Flacone 2 SVCV	Flacone 3 IHN + IPN	Flacone 4 IHN	Flacone 5 Negativo
EPC	L000410	3,75	2,50	3,00	2,75	0,00
	L000438	4,00	2,55	2,50	3,16	0,00
	L000456	3,50	3,50	3,50	3,00	0,00
	L000682	3,50	4,00	4,70	4,00	0,00
	L000951	3,40	3,40	2,60	1,50	0,00
	L000417	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

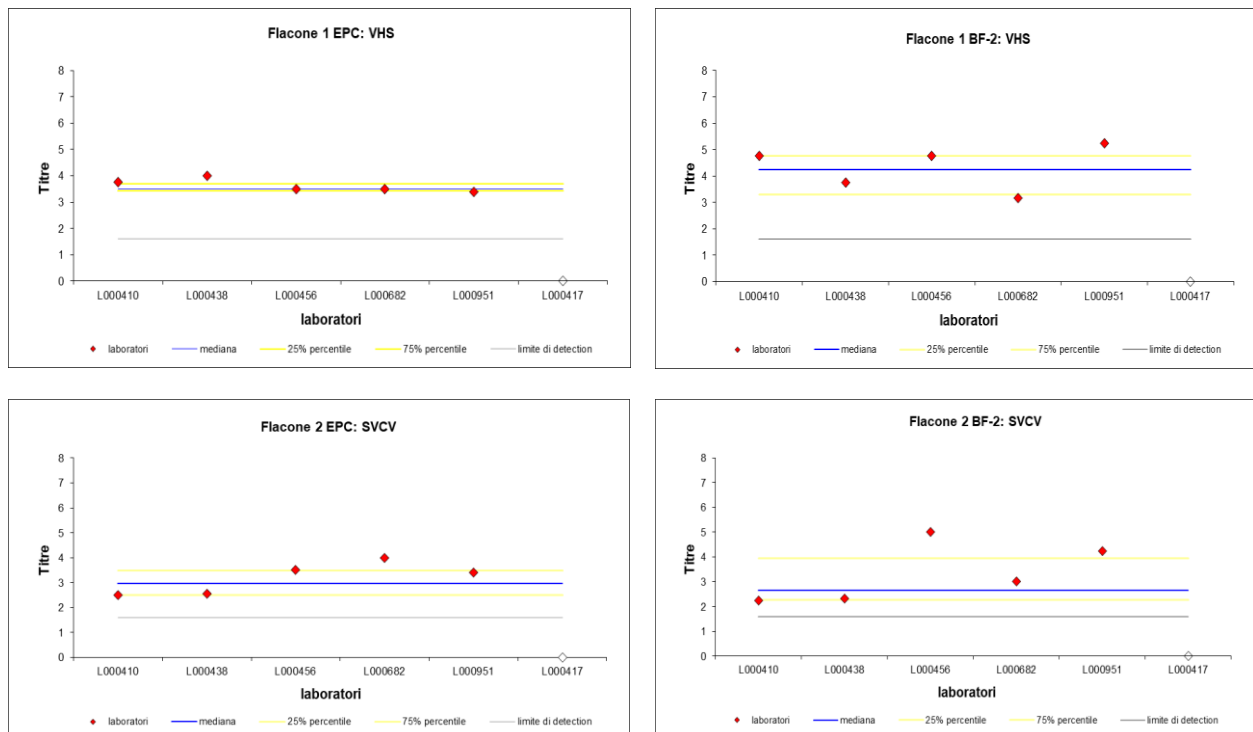
BF-2	L000410	4,75	2,25	3,00	2,64	0,00
	L000438	3,75	2,31	2,67	2,83	0,00
	L000456	4,75	5,00	4,75	4,25	0,00
	L000682	3,17	3,00	4,50	3,67	0,00
	L000951	5,25	4,25	3,75	3,31	0,00
	L000417	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

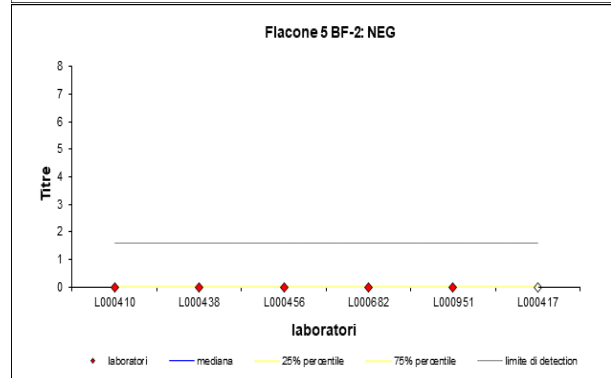
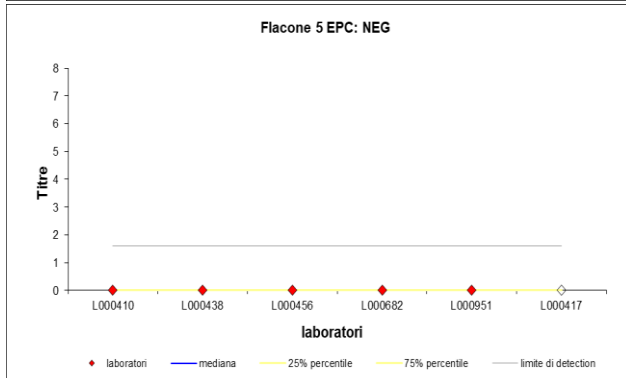
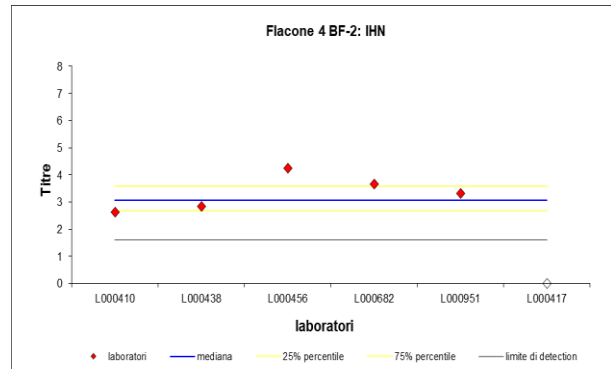
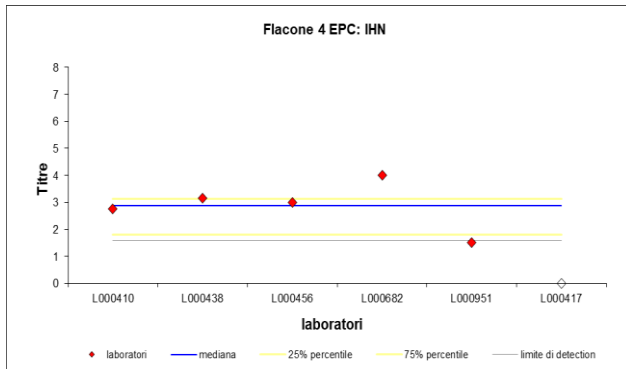
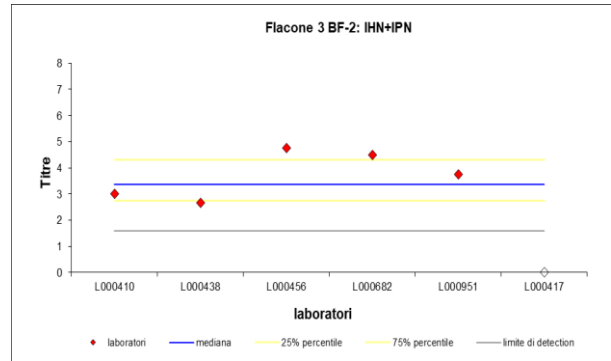
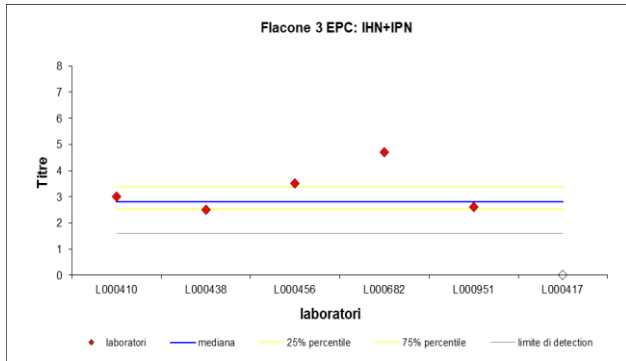
Tabella I2. Statistiche di sintesi dei titoli virali ottenuti dai diversi partecipanti allo schema (espressi come valore dell'esponente) per virus e linea cellulare

EPC	Flacone 1 VHS	Flacone 2 SVCV	Flacone 3 IHN + IPN	Flacone 4 IHN	Flacone 5 Negativo
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	3,50	2,98	2,80	2,88	0,00
Titolo massimo	4,00	4,00	4,70	4,00	0,00
Titolo minimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25% quartile	3,43	2,51	2,53	1,81	0,00
75% quartile	3,69	3,48	3,38	3,12	0,00

BF-2	Flacone 1 VHS	Flacone 2 SVCV	Flacone 3 IHN + IPN	Flacone 4 IHN	Flacone 5 Negativo
N° di laboratori	6	6	6	6	6
Titolo mediano	4,25	2,66	3,38	3,07	0,00
Titolo massimo	5,25	5,00	4,75	4,25	0,00
Titolo minimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25% percentile	3,31	2,27	2,75	2,69	0,00
75% percentile	4,75	3,94	4,31	3,58	0,00

Figura I1. Sensibilità cellulare dei singoli laboratori in EPC e BF-2. Il laboratorio L000417 non ha effettuato la titolazione virale, pertanto nei grafici in Figura I1 il simbolo relativo è di colore bianco.





I.3 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 PT dall'organizzatore del PT, 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 PT $u(\bar{x})$ non è trascurabile rispetto alla deviazione standard target ($u(\bar{x}) > 0,3\sigma_{pt}$), l'Information score viene aggiustato nel seguente modo:

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

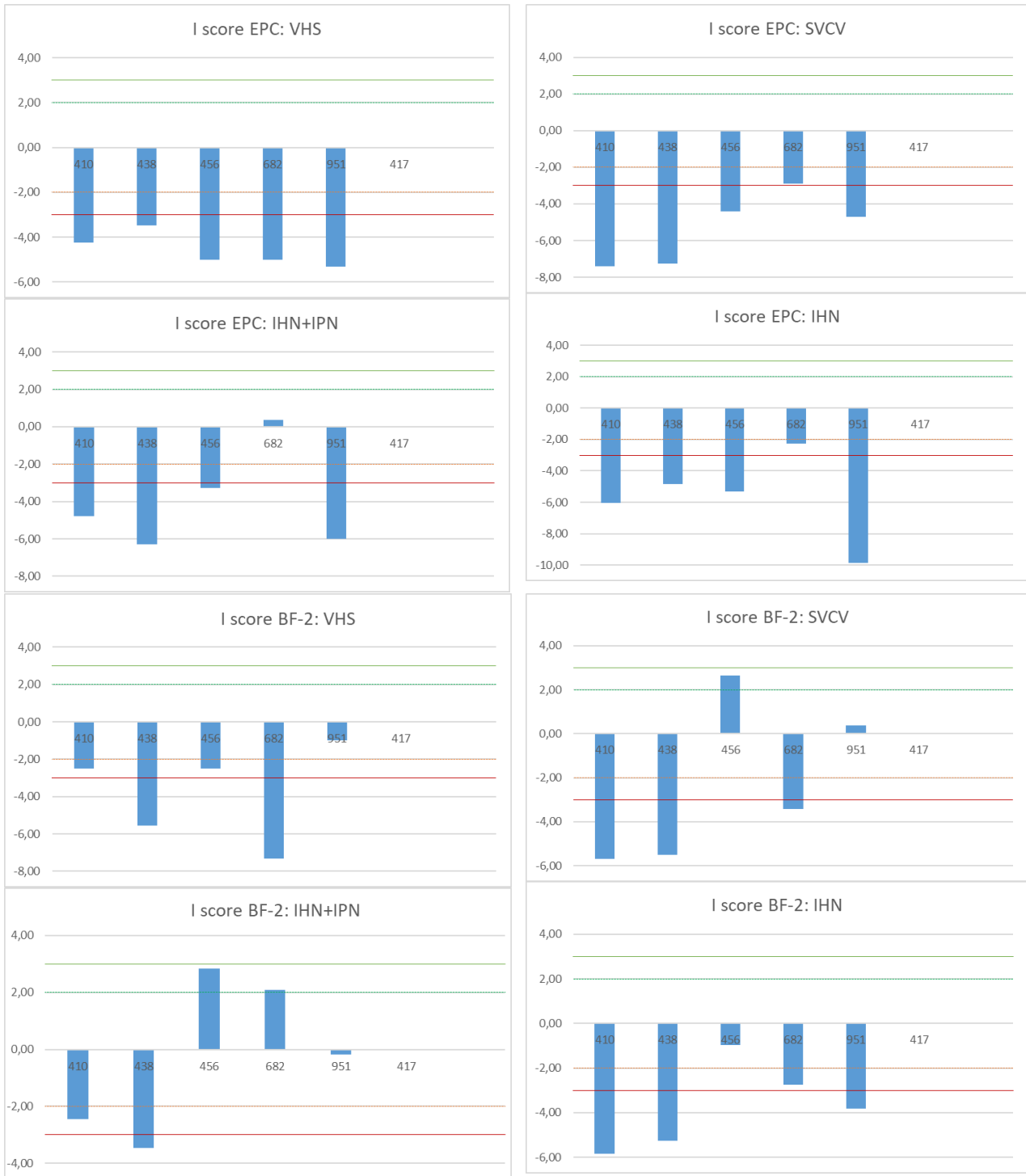
L'interpretazione dell'I-score o I'-score è la seguente:

I-score < -3	Titolazione molto sottostimata rispetto alla media
$-3 \leq I\text{-score} < -2$	Titolazione sottostimata rispetto alla media
$-2 \leq I\text{-score} < 2$	Titolazione in media
$2 \leq I\text{-score} < 3$	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 PT in fase di verifica dell'idoneità dei campioni prova, rapportato ad una variabilità definita "accettabile" dall'organizzatore del PT stesso, fornisce una indicazione oggettiva della sensibilità delle colture cellulari utilizzate dei partecipanti, indipendente dall'esito del PT stesso e monitorabile nel tempo. Una elevata sottostima del titolo virale rispetto a quanto osservato dal Responsabile del PT, 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 I2.

Figura I2. Information score (I) dei laboratori partecipanti allo schema AQUA IV 1-25 (i dati per il flacone n° 5 contenete il campione negativo non sono presentati). Il laboratorio L000417 non ha effettuato la titolazione virale, pertanto nei grafici in Figura I2 non sono presenti i valori di I.



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 PT tutti i laboratori hanno osservato titolo da sottostimati a molto sottostimati per tutti i flaconi sia con la linea cellulare EPC che anche con la linea cellulare BF-2 (ad eccezione del laboratorio L000456 per il falcone n° 2 -contenente SVCv- e 3 -contenente IPNv+IHNv- e del laboratorio L000682 per il flacone 3).

Nonostante la generale sottostima del titolo virale, i laboratori partecipanti (con la sola eccezione di un laboratorio) hanno identificato correttamente il contenuto dei flaconi, pertanto non è stata compromessa la capacità diagnostica. Si consiglia comunque ai laboratori partecipanti di monitorare nel tempo la sensibilità delle linee cellulari in uso nel proprio laboratorio.

Il laboratorio L000417 non ha effettuato la titolazione virale, pertanto nei grafici in Figura I1 il simbolo relativo è di colore bianco.

----- Fine report finale -----