

ORGANIZZAZIONE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO AQUA

Virologia degli organismi acquatici (AQUA IV)

Nome e indirizzo del provider e del coordinatore del "Circuito Interlaboratorio per l'Assicurazione qualità dei risultati - AQUA"	Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie Viale dell'Università 10 – 35020 LEGNARO Coordinatore Dr.ssa Maria Grimaldi Centro Servizi alla Produzione Tel. 049/8084306 e-mail: mgrimaldi@izsvenezie.it
Nome e recapiti del responsabile del circuito AQUA IV	Dr.ssa Anna Toffan SCS6 – Laboratorio di Ittirovirologia Tel. 049/8084333 e-mail: atoffan@izsvenezie.it
Nome e recapiti del responsabile tecnico e statistico del circuito AQUA IV	Responsabile tecnico: Dr.ssa Alessandra Buratin SCS6 - Laboratorio di Ittirovirologia Tel. 049/8084388 e-mail: aburatin@izsvenezie.it Responsabile statistico: Dr.ssa Marzia Mancin Tel. 049/8084431 e-mail: mmancin@izsvenezie.it
Obiettivo e struttura del circuito	L'obiettivo del circuito AQUA IV è monitorare le capacità diagnostiche dei laboratori degli II.ZZ.SS coinvolti nei programmi di riconoscimento delle aziende di trotticoltura e degli altri laboratori privati eventualmente interessati. Il circuito è suddiviso in due schemi: AQUA IV 1 che prevede isolamento e identificazione degli agenti virali dei pesci (VHSV, IHNV, IPNV, SVCV) e AQUA IV 2 per la rilevazione del DNA virale di Herpesvirus della Carpa Koi (KHV) (CyHV-3).
Subappalto delle attività (Nome e recapiti ditta/laboratorio terzi)	Nessuna attività viene subappaltata a terzi.
Esperti tecnici esterni all'Organizzazione del circuito	Nessuno.
Requisiti che permettano la partecipazione	In base allo schema prescelto, possono partecipare laboratori in grado di identificare gli agenti virali incogniti tramite metodiche di virologia e biologia molecolare. Viene inoltre richiesto di indicare il titolo virale dell'agente isolato per valutazioni aggiuntive (non soggette ad accreditamento) di carattere informativo in merito alla sensibilità delle colture cellulari in uso presso il laboratorio partecipante. I laboratori partecipanti non devono possedere strutture ad elevato livello di biosicurezza e/o biocontenimento in quanto trattasi di agenti virali non inclusi nell'allegato XLVI del D. Lgs 09/04/2008 n. 81. Le iscrizioni dei nuovi clienti avvengono on-line tramite il sito web dell'IZSVe. L'iscrizione attribuisce al partecipante un codice alfa-numerico univoco e anonimo che consente l'accesso personalizzato (con utente e password) al gestionale Aquaweb. I clienti già iscritti, devono accedere ad Aquaweb per le successive partecipazioni.

	Con l'iscrizione al circuito AQUA il cliente accetta le condizioni generali di contratto pubblicate sul sito dell'istituto.
Numero e tipologia di partecipanti attesi	I partecipanti attesi sono gli II.ZZ.SS del territorio italiano che svolgono attività di controllo ai fini del riconoscimento ai sensi del Reg Del UE 2020/689 17/12/2019 GU UE L174 03/06/2020 e tutti gli altri laboratori pubblici o privati che fossero interessati. In caso di un numero eccessivo di partecipanti, sarà data priorità agli Istituti Zooprofilattici e poi agli altri iscritti in ordine di iscrizione fino ad esaurimento dei pannelli. Il numero massimo di partecipanti è fissato a n°10 iscritti. Non è necessario un numero minimo di partecipanti dato che le prove sono di tipo qualitativo.
Normativa e legislazione di riferimento	Per la gestione del Circuito Interlaboratorio: <ul style="list-style-type: none"> - ISO/IEC 17043 - ISO/IEC 17025 - ISO 13528 Per le prove di omogeneità e stabilità: <ul style="list-style-type: none"> - WAOH (ex OIE) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, capitolo 2.3.9 "Infection with spring viraemia of carp virus", par. 4.3 e par. 4.9.2, 2023 - DTU EU-RL AQUA Fish VHS-IHN Vers 2 2021 - PDP ITT 013, rev. 07, Ricerca del virus della Necrosi pancreatica infettiva mediante isolamento su colture cellulari - PDP ITT 024, rev. 02, Identificazione del virus della Necrosi pancreatica infettiva mediante immunofluorescenza - PDP ITT 101, rev. 04, Rilevazione dell'Herpes virus della Carpa koi (KHV) mediante real time PCR Per le prove accreditate secondo norma ISO/IEC 17025 si rimanda all'elenco prove pubblicato sul sito web di Accredia.
Tipologie di campioni prova	<ul style="list-style-type: none"> - Schema AQUA IV 1: 5 flaconi in doppio contenenti virus liofilizzati (2 flaconi da unire per ciascun ceppo da identificare) contraddistinti dai numeri 1 – 2 – 3 – 4 – 5. Lo schema è valido per le metodiche di diagnostica delle malattie virali delle specie ittiche. Lo schema prevede isolamento e identificazione degli agenti virali VHSv, IHNv, IPNv, SVCv. - Schema AQUA IV 2: 5 flaconi contenenti virus liofilizzato contraddistinti dai numeri 1 – 2 – 3 – 4 – 5. Lo schema prevede la rilevazione presenza/assenza di KHV (Herpesvirus della Carpa koi) mediante metodi molecolari. <p>Ogni laboratorio riceverà i pannelli relativi agli schemi per il quale si è iscritto.</p>

<p>Analisi previste e calendario di pianificazione degli invii degli schemi</p>	<p>Identificazione dei seguenti agenti virali:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Virus della Setticemia Emorragica Virale (SEV/VHSv); - Virus della Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI/IHNv); - Virus della Viremia Primaverile della Carpa (VPC/SVCv) - Virus della Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI/IPNv) - Herpesvirus della Carpa Koi (KHVv) <p>I metodi da applicare sono a scelta del partecipante ma devono essere tra quelli previsti dal Diagnostic manual DTU EU-RL AQUA Fish VHS-IHN Vers 2 2021, dal WOAH (ex OIE) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (Capitolo 2.3.9, 2023) e i metodi di prova interni consigliati dal CRN per i virus non soggetti a normativa specifica. Il metodo d'elezione per l'esecuzione dello schema AQUA IV 1 è l'isolamento virale seguito da identificazione virale mediante immunofluorescenza. In caso di utilizzo di metodiche diverse e/o in caso di esiti discordanti, verrà utilizzato il seguente ordine di priorità per la comparazione dei risultati: immunofluorescenza, metodiche biomolecolari, metodi immunoenzimatici (i.e. ELISA).</p> <p>Il metodo d'elezione per l'esecuzione dello schema AQUA IV 2 è la real time PCR (rPCR) seguita dalla PCR endpoint. I metodi qualitativi applicati dai partecipanti, per ogni schema, sono da considerarsi tra loro equivalenti per la successiva fase di elaborazione statistica dei risultati.</p> <p>Verso fine anno viene predisposto e pubblicato sul sito web IZSve un calendario con le date e le analisi previste per il circuito dell'anno successivo.</p>
<p>Contenuto e preparazione dei campioni prova</p>	<p>I campioni prova contengono 0.5 ml di surnatante di colture cellulari infettate con agenti virali dei pesci, miscelati nel rapporto 1:1 con una soluzione acquosa di idrolizzato di lactalbumina al 20% p/v. Gli agenti virali vengono prodotti partendo da materiale di riferimento certificato.</p>
<p>Stoccaggio e distribuzione dei campioni prova</p>	<p>I campioni liofilizzati vengono sigillati nelle vials sterili mediante tappo in gomma e ghiera in alluminio, identificati da un codice numerico che identifica il campione prova da esaminare.</p> <p>L'invio dei campioni prova viene eseguito in ghiaccio secco, questa attività è gestita dall'IZSve che opera attraverso corrieri specializzati in servizi logistici.</p>
<p>Numero di distribuzioni per anno per ogni tipologia di analisi sulla stessa matrice</p>	<p>Una distribuzione per ciascun schema.</p>
<p>Numero di campioni prova per schema</p>	<p>Si prevede l'invio di 5 campioni prova per schema.</p> <p>Per AQUA IV 1 le vials sono due per ogni campione prova e vanno unite tra di loro.</p>
<p>Informazioni tecniche specifiche</p>	<p>Le informazioni riguardanti i campioni prova (pubblicate in Aquaweb) sono le seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Modalità di ricostituzione, conservazione e processazione dei campioni prova; - Suggestioni sulle analisi da effettuare e metodiche da utilizzare; - Modalità di registrazione dei risultati tramite Aquaweb; - Date di invio dei pannelli, periodo per l'esecuzione delle prove e data ultima di invio risultati; - Scheda di sicurezza.
<p>Controlli di qualità (prove di omogeneità e stabilità) eseguiti su ogni lotto di produzione di campioni prova</p>	<p>Schema AQUA IV 1: La verifica di idoneità del lotto di produzione pre-liofilizzazione viene condotta per ogni virus di interesse attraverso immunofluorescenza (IF) per escludere contaminazioni ed essere considerati idonei per la preparazione dei lotti.</p> <p>La verifica dell'omogeneità del lotto di produzione post-liofilizzazione viene verificata analizzando per ogni virus di interesse tre flaconi, selezionati random dal lotto di produzione mediante IF. Il lotto liofilizzato è considerato omogeneo se i virus vengono correttamente identificati in quanto concordi con il risultato atteso e sono escluse eventuali contaminazioni.</p>

Per avere una indicazione della titolazione dei lotti di produzione post liofilizzazione, vengono controllati 5 flaconi, selezionati random, per ogni virus oggetto del test, eseguendo, per ognuno di essi, la titolazione su entrambe le linee cellulari (EPC e BF-2).

Se il lotto non è omogeneo o non presenta una idonea titolazione, viene eliminato.

L'identificazione del virus non è soggetta a cambiamenti nel tempo ed è quindi da ritenersi stabile, come tale, nel periodo di esecuzione del circuito. Si possono avere però delle perdite del titolo virale fino alla degradazione totale. Per escludere tale ipotesi, viene verificata la titolazione su entrambe le linee cellulari, prima dell'invio dei campioni prova ai laboratori e alla fine del periodo di analisi del circuito, su 5 flaconi selezionati random, per ogni virus oggetto del test su entrambe le linee cellulari.

In caso di riduzione o aumento della titolazione virale di valori superiori a un logaritmo, i campioni prova non vengono ritenuti idonei all'esecuzione del circuito e il lotto viene eliminato o, nel caso sia stato già inviato ai partecipanti, viene data loro tempestiva comunicazione.

Schema AQUA IV 2: La verifica di idoneità del lotto di produzione pre-liofilizzazione viene condotta analizzando una aliquota della flask mediante rPCR. Appurata la congruità del risultato, il contenuto della flask viene aliquotato in vials. Sui campioni prova liofilizzati viene verificata l'omogeneità prelevando random 3 flaconi del lotto di produzione. Il lotto liofilizzato è considerato omogeneo se l'esito osservato di positività/negatività ottenuto in rPCR è uguale a quello atteso. In caso di non omogeneità il lotto viene eliminato.

Durante il periodo di esecuzione del circuito, viene verificato il contenuto virale nei campioni prova per escluderne la degradazione, prelevando 5 campioni random, all'inizio e alla fine del periodo di esecuzione del circuito, per ogni lotto utilizzato.

L'assenza di degradazione consiste nel verificare in rPCR che l'esito osservato di positività/negatività sia uguale a quello atteso.

In presenza di degradazione, i campioni prova non vengono ritenuti idonei all'esecuzione del circuito e il lotto viene eliminato o, nel caso sia stato già inviato ai partecipanti, viene data loro tempestiva comunicazione.

<p>Metodi statistici utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei partecipanti</p>	<p>Entrambi gli schemi sono di tipo qualitativo. 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 questo motivo, non si necessita di un numero minimo di partecipanti per l'attivazione e l'elaborazione dei dati del circuito interlaboratorio. Anche un solo laboratorio può prendere parte al circuito ed essere valutato in relazione al valore assegnato.</p> <p>Per i circuiti di tipo qualitativo 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. La valutazione della performance viene effettuata attribuendo dei punteggi alle risposte dei partecipanti in relazione al valore assegnato.</p> <p>Se la somma del punteggio ottenuto è superiore o uguale all'80% del massimo punteggio possibile, la prestazione del laboratorio è ritenuta accettabile dal Responsabile del circuito AQUA IV.</p> <p>Per lo schema AQUA IV 1 viene fornita una ulteriore elaborazione, non valutativa e non soggetta ad accreditamento, ma informativa in merito allo stato delle linee cellulari utilizzate dai laboratori partecipanti. Lo scopo di tale elaborazione è quello di suggerire, dove eventualmente siano presenti evidenti problemi di perdita di sensibilità, la sostituzione delle cellule impiegate con altri cloni di adeguata sensibilità. Tale indicazione viene data sulla base di un indice definito "information score" che viene 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. Tale indice 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 la sostituzione delle cellule impiegate con altri cloni di adeguata sensibilità.</p>
<p>Emissione report</p>	<p>Dopo l'arrivo dei risultati dei partecipanti, in attesa del report definitivo, viene pubblicato in Aquaweb un report parziale che riporta il valore atteso. Il report parziale viene pubblicato in Aquaweb entro 1 mese dalla data ultima prevista per l'esecuzione del circuito. Una volta pubblicato il report parziale, i risultati inviati non possono più essere modificati.</p> <p>Il report definitivo contiene, oltre ai risultati ottenuti dai partecipanti, alla loro elaborazione ed alla valutazione della loro performance (espressi con tabelle e grafici), le seguenti indicazioni:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caratteristiche dei campioni inviati, metodiche utilizzate per la loro preparazione e controllo dei campioni prova; - Valutazione dell'omogeneità e stabilità in termini di concordanza con il risultato atteso. I singoli risultati delle prove effettuate sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzazione; - Informazioni sulle specifiche analisi statistiche utilizzate per la valutazione dell'idoneità virale post liofilizzazione e durante il periodo di esecuzione del circuito: vengono riportati i valori finali elaborati dell'idoneità virale. I singoli risultati delle prove effettuate sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzazione; - I criteri di valutazione della performance dei partecipanti; - Valore assegnato dei campioni prova; - Indicazioni sulla sensibilità delle colture cellulari dei partecipanti; - Commenti e raccomandazioni basati sui risultati del circuito interlaboratorio.

	<p>I risultati trasmessi dai laboratori sono resi anonimi tramite i codici identificativi alfa-numeriche propri del laboratorio stesso.</p> <p>Il report definitivo viene pubblicato sul sito web dell'IZSVE ed in Aquaweb entro 3 mesi dalla data ultima prevista per l'esecuzione.</p> <p>In caso di performance non conformi, è possibile richiedere all'Organizzazione la ripetizione delle prove entro 2 mesi dalla data di emissione del report definitivo.</p> <p>I campioni prova e la spedizione sono gratuiti per gli istituti pubblici appartenenti alla rete di sorveglianza nazionale, mentre nel caso di partecipazione di laboratori privati le spese sono a carico del destinatario.</p> <p>Nel caso in cui uno schema venga distribuito e si dimostri all'analisi statistica non adatto per la valutazione della performance, lo stesso viene annullato e ne viene data comunicazione ai partecipanti tramite email, da parte del responsabile del circuito, e tramite report finale.</p> <p>Tutti i documenti di registrazione inerenti il circuito interlaboratorio vengono conservati per 10 anni, salvo diverse disposizioni di legge, nel qual caso prevalgono queste ultime.</p>
Comunicazione con i partecipanti	<p>I partecipanti possono comunicare con l'Organizzazione del circuito in qualsiasi momento (prima dell'inizio delle prove, in ogni fase del circuito o successivamente, per chiedere chiarimenti sulle modalità operative, per necessità legata all'esecuzione delle prove, chiarimenti sui risultati ottenuti e gestione delle non conformità) tramite e-mail o telefonicamente, anche nel caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova.</p> <p>Eventuali cambiamenti nel programma o nelle operazioni dello schema vengono immediatamente comunicate.</p> <p>I partecipanti possono appellarsi relativamente alla valutazione della loro performance entro 2 mesi dalla pubblicazione del report definitivo.</p> <p>Sono auspicabili informazioni di ritorno da parte dei partecipanti, al fine di migliorare costantemente il servizio.</p> <p>In ogni schema AQUA IV, alla pubblicazione del Report definitivo viene aperta la sezione: "CUSTOMER SATISFACTION" dove il partecipante può valutare lo schema in oggetto, cliccando lo smile verde, giallo o rosso. Il partecipante può lasciare anche le sue osservazioni e/o suggerimenti, in particolare se è stato selezionato lo smile giallo o rosso. I dati di customer satisfaction raccolti sono trattati ed utilizzati dall'IZSVE, organizzatore del circuito interlaboratorio AQUA, nel rispetto della riservatezza e della privacy, secondo quanto previsto dal Regolamento UE 2016/679, allo scopo di migliorare continuamente il servizio offerto. I dati di customer satisfaction inviati non sono anonimi allo scopo di poter dialogare direttamente con i laboratori, in base ai commenti, suggerimenti o critiche espressi nel campo testuale della sezione, relativa ad ogni schema AQUA IV. Entro due mesi dalla data di emissione del report, i dati di customer satisfaction raccolti verranno valutati, per poter operare tempestivamente azioni correttive e/o di miglioramento. Le valutazioni degli schemi possono peraltro essere inserite anche dopo i due mesi. In tale caso la valutazione dei dati di customer satisfaction avviene in fase di riesame annuale della Direzione che viene svolto i primi mesi dell'anno successivo.</p>