

PDP IMM 063

Ricerca degli anticorpi verso virus influenzali di tipo "A" mediante agar gel immunodiffusione (AGID)

**(Manuale diagnostico di cui alla decisione
2006/437/CE)**

0. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
00	30.09.2010	Revisione per nuova codifica (ex PDP VIR 03), adeguamento normativa e nuova modulistica	Dr.C.Terregino	RQ-Dr.A.Cereser	Direttore Sanitario Dr.S. Marangon
01	18.01.2012	Adeguamento normativa e modulistica	Dr.C.Terregino	RQ-Dr.A.Cereser	Direttore Sanitario Dr.S. Marangon

1.Scopo e campo di applicazione

La presente procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca degli anticorpi nei confronti dell' antigene di gruppo specifico dei virus influenzali di tipo A nel siero di volatili non acquatici mediante la prova di agar gel immuno-diffusione (AGID). Questa procedura si applica quando si intende rilevare la presenza di anticorpi nei confronti di qualsiasi sottotipo di virus influenzale di tipo A.

La presente procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la ricerca degli anticorpi contro gli antigeni di gruppo specifici dei virus influenzali aviari nei volatili non - acquatici mediante la prova di agar gel immunodiffusione (AGID). Essendo l'antigene di gruppo comune a tutti i virus influenzali di tipo A, questa

prova permette di svelare gli anticorpi indotti da qualunque sottotipo di virus influenzale. Non si applica ai sieri degli anseriformi, in quanto questi volatili hanno una scarsa produzione di anticorpi precipitanti.

2. Documenti di riferimento

- Decisione commissione 2006/437/CE che approva un manuale diagnostico per l'influenza aviaria secondo quanto previsto dalla direttiva 2005/94/CE del Consiglio
- DPR 656/96 "Regolamento per l'attuazione della direttiva 92/40/CEE che istituisce misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria" cap 9
- Beard C.W. 1970. Demonstration of type specific antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion Bull. W.H.O. 42 : 779 - 785.
- OIE Terrestrial Manual 2009 – chapter 2.3.4.
- Decreto legislativo 25 gennaio 2010, n.9

3. Definizioni e acronimi utilizzati

Agar gel immuno-diffusione (AGID): test in grado di evidenziare la reazione antigene-anticorpo attraverso la formazione di un complesso insolubile visibile sotto forma di bande di precipitazione a partire da reagenti (antigene ed anticorpo) solubili.

4. Descrizione delle attività e responsabilità

Il Responsabile del Laboratorio o un suo delegato ha la responsabilità dell'organizzazione, del coordinamento e della verifica delle attività svolte da personale tecnico qualificato all'esecuzione della presente procedura di prova.

Il personale tecnico qualificato ha la responsabilità della corretta esecuzione della procedura di prova qui descritta.

4.1. Attrezzature/strumenti/accessori

- Piastre Petri da 90 mm di diametro
- Micropipette a volume variabile 5 - 50 μ l
- Puntali
- Pipette
- Vetreria sterile
- Matracci sterili da 200-300 ml
- Bilancia tecnica
- Fornello/forno a microonde
- Pompa a vuoto
- Stampo in acciaio formato da sette piccoli tubi calibrati e affilati di forma cilindrica, tale da ricavare nell'agar gruppi di pozzetti costituiti da un pozzetto centrale del diametro di 4.55 mm e sei periferici, del diametro di 5.42 mm e distanti tra loro 3 mm
- Frigorifero + 4 °C \pm 3 °C
- Congelatore - 80 °C \pm 10 °C
- Congelatore - 20 °C (+2 - 10) °C
- Illuminatore a luce diffusa
- Camera umida: può essere costituita da una vaschetta con coperchio con all'interno della carta imbevuta d'acqua
- Sacco di plastica
- Dispositivi di protezione individuale (DPI) indicati al p 4.3

4.2. Reagenti/soluzioni/kit diagnostici

- Antigene per gel-diffusione, liofilizzato e conservato a -20°C fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6
- Siero positivo di referenza liofilizzato e conservato a -20°C fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6
- Agar Noble prodotto commerciale
- NaCl prodotto commerciale
- Acqua distillata

4.3. Norme di sicurezza

4.3.1. Manipolazione di campioni identificati con bollino o timbro di "RISCHIO SANITARIO"

ACCESSO AI LABORATORI E NORME DI COMPORTAMENTO	
Prima di iniziare le varie fasi di processo è obbligatorio indossare i seguenti DPI: tuta monouso o camice, guanti in lattice o nitrile monouso EN374 (protezione da microrganismi), maschera con filtro P3 (facciale filtrante P3 con valvola d'espiazione EN149 –FFP3 –CE 0086) e occhiali protettivi (EN 166). I seguenti DPI devono essere indossati durante tutte le fasi della lavorazione dentro e fuori cappa.	
FASI DI PROCESSO	MISURE DI PREVENZIONE DA APPLICARE
Preparazione del campione per esame sierologico.	Utilizzare gli appositi DPI ed i sistemi di aspirazione
Esecuzione dell'analisi	Utilizzare gli appositi DPI
<u>Lettura piastre</u>	<u>Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso</u>

4.3.2. Manipolazione di campioni per esame sierologico:

FASI DI PROCESSO	MISURE DI PREVENZIONE DA APPLICARE
Preparazione del campione per esame sierologico.	Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
<u>Preparazione dell' agar su piastre Petri</u>	Forno a microonde: utilizzo della visiera e dei guanti anticalore.
Esecuzione dell'analisi	Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
<u>Lettura piastre</u>	Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso
<u>Per tutte le fasi di processo</u>	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

4.4. Modalità operative

4.4.1 Preparazione delle piastre di agar

- Sciogliere in un matraccio contenente 100 ml di acqua distillata gr 8 di NaCl
- Aggiungere 1,25 g di agar Noble e agitare delicatamente
- Immergere il matraccio in un bagnomaria in ebollizione per permettere lo scioglimento dell'agar, oppure immergerlo nel forno a microonde (per 100 ml di agar a max potenza per circa 5')

- Agitare delicatamente il matraccio ed osservare controluce per verificare che l'agar si sia sciolto completamente, altrimenti ripetere il punto precedente
- Distribuire, su di una superficie perfettamente orizzontale con una pipetta graduata, 15 ml della soluzione di agar in piastre Petri da 90 millimetri di diametro
- Lasciare raffreddare e solidificare l'agar nelle piastre a temperatura ambiente senza coperchio
- Chiudere le piastre, scrivere la data di produzione sul coperchio porre le piastre in un sacco di plastica e sigillarlo, apporre apposita etichetta con indicata la data di scadenza del lotto di piastre.
- Porle così sigillate in frigorifero capovolte (per evitare che la condensa si accumuli) per non oltre 15 giorni.

4.4.2 Esecuzione dell'analisi

- Portare a temperatura ambiente un numero sufficiente di piastre per i campioni in esame e contrassegnare le piastre sulla parte laterale con il numero di registro identificativo dei campioni in corso. Riportare tutti i dati relativi al numero di piastra, lotto e data di produzione dell'agar sul fondo della stessa, e compilare l'apposito foglio di lavoro DSBIO MOD 004 "Scheda registrazione dati per prova di agar gel immunodiffusione".
- Praticare sullo strato di agar fori utilizzando l'apposito stampo come indicato nello schema, aspirando l'agar dai pozzetti con un apposito puntale in acciaio collegato ad una pompa a vuoto
- Distribuire 25 µl di antigene (Ag) nel pozzetto centrale e, nella medesima quantità, l'antisiero positivo (S+) in due pozzetti periferici diametralmente opposti, e i sieri in esame (SE) nei rimanenti pozzetti, come indicato nello schema

SE SE
S+ Ag S+
SE SE

- Incubare le piastre in camera umida a temperatura ambiente per 48 ore
- Per una corretta lettura e registrazione dei dati seguire il senso della freccia indicata nell'apposito modulo DSBIO MOD 004.

4.5 Espressione dei risultati

Dopo 48 h osservare le piastre appoggiate nell'illuminatore per apprezzare le bande di precipitazione. La prova si considera valida se si osserva la banda di precipitazione fra i pozzetti contenenti l'antisiero positivo e quello centrale contenente l'antigene.

Qualora i controlli non dovessero fornire i risultati attesi, deve essere contattato il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato il quale fornirà indicazioni sui provvedimenti da prendere per la risoluzione del problema.

In caso di negatività del campione non si osserverà la banda di precipitazione tra antigene e siero in esame, ma sarà comunque presente una banda di precipitazione fra l'antigene e l'antisiero positivo: il campione viene definito "negativo".

In caso di positività del campione in esame, si osserverà una banda di precipitazione tra antigene e siero in esame in continuità con la banda di precipitazione ottenuta fra l'antigene e l'antisiero positivo: il campione viene definito "positivo" oppure contrassegnato con il simbolo "+".

Il campione che fornisce risultati diversi da quelli descritti per i sieri positivi viene definito come "negativo".

4.6. Caratteristiche del metodo

Essendo la prova una prova normata a livello nazionale e dell' UE, è pertanto considerata metodica di riferimento o "gold standard". La corretta esecuzione della prova viene valutata osservando la banda di precipitazione in corrispondenza del siero di riferimento positivo, in ogni seduta di lavoro.

4.7 Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento al dedicato allegato 06 della IO ISZV 033 "Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di tipo sierologico", che costituisce parte integrante della presente procedura.

4.8 Rapporto di prova

Il rapporto di prova viene redatto, approvato ed emesso in conformità a quanto previsto a questo riguardo dal Manuale della Qualità Sez. 5.10.

5. Documenti allegati e/o correlati

DSBIO MOD 004 : "Scheda registrazione dati per prova di agar gel immunodiffusione"
Allegato 06 della IO IZSV 033 "Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di tipo sierologico" .