

## 1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Virus influenzali aviari	Liquido allantoideo, organi, tamponi, feci di specie aviare	Isolamento in uova embrionate, test di inibizione dell'emoagglutinazione, indice di patogenicità intravenoso

## 2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap 3.3.4, par. B 1.2, 1.3, 1.4, 2021

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR 005V

## 3. Attrezzature, apparecchiature e consumabili

Dotazione base di un laboratorio di virologia (**ALL PDP 279 B** - Apparecchiature, reagenti, attrezzature e materiali consumabili per virologia).

## 4. Reagenti, soluzioni, kit diagnostici e materiali di riferimento

Dotazione base di un laboratorio di virologia (**ALL PDP 279 B**) con le seguenti integrazioni e/o specifiche:

Prodotto	Fornitore/Specifiche	Conservazione
Agar Sangue Medium AS	Fornito da CSP – Centro Servizi Produzione	Tra +2°C e +8°C
Pannello di sieri policlonali specifici anti emoagglutinine H1-H16	SCS6 - U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione / istruzione " <b>DSBIO IOP 058</b> - Produzione di sieri policlonali in volatili domestici mediante l'uso di antigeni inattivati"	Tra +2°C e +8°C o ≤ -18°C
Polli SPF di 6 settimane	SCS3 Laboratorio Veterinario Centralizzato protezione animali utilizzati a fini scientifici stabulario BSL3	21°C idealmente e comunque nel range 15-25 come raccomandato dalla Commissione Europea del 18/6/2007
Sabbia di quarzo sterile	Commerciale	Temperatura ambiente
Uova embrionate SPF (9-11 giorni di incubazione)	Commerciale	+37 ± 2 °C

### 4.1 Preparazione delle soluzioni

La soluzione di globuli rossi all'1% viene preparata seguendo l'istruzione "**IZS IDD 146** - Preparazione di sospensioni di globuli rossi di specie aviare".

## 5. Verifiche da effettuare prima di iniziare la prova

Vedere istruzione “**IZS IDD 069** - Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria e malattia di Newcastle”.

## 6. Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Conservare il campione secondo

- “**IZS IDD 007** – Modalità di conservazione dei campioni”ù;
- **IZS IDD 069**.

## 7. Norme di sicurezza

### 7.1 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 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 virologico.	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare gli appositi DPI e gli appositi sistemi di aspirazione
Speratura uova	Utilizzare gli appositi DPI
Inoculazione uova	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare gli appositi DPI, gli appositi sistemi di aspirazione e gli adeguati raccoglitori per rifiuti sanitari taglienti e pungenti
Incubazione uova	Utilizzare gli appositi DPI
Esecuzione dell'analisi	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare gli appositi DPI, gli appositi sistemi di aspirazione e gli adeguati raccoglitori per rifiuti sanitari taglienti e pungenti
Lettura piastre	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare gli appositi DPI
Per tutte le fasi di processo	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

### 7.2 Manipolazione di campioni per esame virologico

Accesso ai laboratori e norme di comportamento
E' obbligatorio indossare durante tutte le fasi dell'attività: abbigliamento e calzature da laboratorio.

FASI DI PROCESSO	MISURE DI PREVENZIONE DA APPLICARE
Preparazione del campione per esame virologico.	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare guanti monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
Speratura uova	Utilizzare guanti monouso e gli appositi occhiali protettivi
Inoculazione uova	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare guanti monouso, gli appositi sistemi di aspirazione e gli adeguati raccoglitori per rifiuti sanitari taglienti e pungenti
Incubazione uova	Utilizzare guanti monouso
Esecuzione dell'analisi	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare guanti monouso, gli appositi sistemi di aspirazione e gli adeguati raccoglitori per rifiuti sanitari taglienti e pungenti
Lettura piastre	Eseguire le operazioni sotto cappa di sicurezza biologica Biohazard classe II, utilizzare guanti monouso
Per tutte le fasi di processo	<b>Avvertenze:</b> frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

## 8. Modalità operative

<b>PREPARAZIONE CAMPIONE</b>	<p>Per la tracciabilità compilare il foglio di lavoro “<b>DSBIO MOD 007</b> - Scheda registrazione dati per prova di isolamento virale su uova”.</p> <p><b>Tamponi</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lasciare agire il campione con la soluzione di PBS antibiotata (volume finale 1 ml) per almeno 1-2 ore a temperatura ambiente.</li> <li>• In particolari condizioni, ad esempio in caso di emergenze epidemiche <u>il dirigente di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di eseguire l'analisi in pool di 5 o 10 tamponi, a partire da campioni provenienti dal medesimo apparato e unità epidemiologica campionata.</li> <li>• Centrifugare il campione a 1000 x g per 10 minuti a temperatura tra +2°C e +8°C</li> <li>• Se l'inoculazione delle uova embrionate non viene effettuata il giorno stesso, il surnatante trasferito in un nuovo provetta sterile (inoculo per uova SPF), può essere mantenuto tra +2°C e +8 °C fino a 4 giorni o congelato a ≤ - 70°C fino al momento dell'esecuzione dell'esame.</li> <li>• In condizioni di sterilità utilizzare il surnatante per infettare le uova embrionale di pollo SPF (9-11 giorni di incubazione) come descritto nel riquadro “Analisi”.</li> </ul> <p><b>Organi</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• In condizioni di sterilità, prelevare una quantità di campione paragonabile ad un cubo di un circa 1 cm<sup>3</sup> usando pinza e forbici sterili. Gli organi prelevati possono essere uniti in pool in base all'apparato a cui appartengono (esempio: pool di trachea e polmoni per l'apparato respiratorio, pool di duodeno, pancreas e tonsille cecali per l'apparato enterico, pool di organi della cavità celomatica quali fegato, milza, cuore e rene e infine campioni di cervello).</li> <li>• Omogenizzare il campione in un mortaio sterile con l'aggiunta di sabbia di quarzo sterile.</li> <li>• Aggiungere 9 ml di soluzione di PBS antibiotata.</li> <li>• Raccogliere l'omogenato in una provetta sterile per centrifuga da 15 ml.</li> <li>• Lasciare l'omogenato tra +2°C e + 8°C per 1 ora.</li> <li>• Centrifugare il campione a 1000 x g per 15 minuti a temperatura tra +2°C e +8°C e trasferire il surnatante in una nuova provetta sterile (inoculo per uova SPF).</li> </ul>
----------------------------------	---

- Se l'inoculazione delle uova embrionate non viene effettuata il giorno stesso, il surnatante può essere mantenuto tra +2°C e +8°C fino a 4 giorni o congelato a ≤ -70°C fino al momento dell'esecuzione dell'esame.
- Utilizzare il surnatante per infettare le uova embrionale di pollo SPF (9-11 giorni di incubazione) come descritto nel riquadro "Analisi".

#### Feci

- In condizioni di sterilità prelevare una quantità di feci pari a 1 g e omogenizzare il campione in un mortaio sterile con l'aggiunta di sabbia di quarzo e soluzione di PBS antibiotata quanto basta per produrre una sospensione 10-20% (w/v).
- Raccogliere l'omogenato nella provetta contrassegnata sterile per centrifuga da 15 ml.
- Lasciare l'omogenato tra +2°C e +8°C per 1 ora.
- Centrifugare il campione a 1000 x g per 15 minuti a temperatura tra +2°C e +8°C e per la matrice feci trasferire il surnatante ottenuto in una nuova provetta sterile operando la filtratura con filtro 0,45 µm (inoculo per uova SPF).
- Se l'inoculazione delle uova embrionate non viene effettuata il giorno stesso, il surnatante può essere mantenuto tra +2°C e +8°C fino a 4 giorni o congelato a ≤ -70°C fino al momento dell'esecuzione dell'esame.
- Utilizzare il surnatante per infettare le uova embrionale di pollo SPF (9 - 11 giorni di incubazione) come descritto nel riquadro "Analisi" Isolamento virale.

#### Liquido allantoideo

Il Laboratorio in quanto centro di riferimento può ricevere da laboratori terzi campioni di liquido allantoideo da testare per conferma. In questo caso il campione non necessita di alcuna preparazione e viene processato direttamente per la "Tipizzazione preliminare mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione con sieri policlonali anti H1-H16" (vedi riquadro "Analisi").

#### PREDISPOSIZIONE CONTROLLI

- **Controllo globuli in HA e HI:** preparati seguendo istruzione **IZS IDD 146**.
- **Controllo delle 4 HAU/controllo virus:** diluendo in PBS il virus isolato.
- **Siero di riferimento positivo e negativo:** preparati seguendo istruzione **DSBIO IOP 058**.

#### ESECUZIONE ANALISI

#### Inoculazione, incubazione e speratura delle uova embrionate (primo passaggio)

- Preparare per ogni campione almeno 4 uova SPF al 9°-11° giorno di incubazione per l'inoculazione in cavità allantoidea (modulo **DSBIO MOD 007**).
- Su ogni uovo praticare un foro al di sopra della linea che delimita la camera d'aria e inoculare 0.1 ml-0.2 ml di materiale in esame in cavità allantoidea.
- Sigillare le uova ed incubarle in termostato a +37°C per la durata di sei giorni (primo passaggio).
- Sperare le uova giornalmente (modulo **DSBIO MOD 007**).
- Le uova contenenti embrioni morti o morenti entro la sesta giornata dall'inoculazione (primo passaggio) devono essere aperte in condizioni di sterilità previo stoccaggio delle uova a temperatura di refrigerazione tra +2°C e +8°C per almeno 4-8 ore.
- Raccogliere 2-5 ml di liquido allantoideo di ciascun uovo e trasferirlo in provetta (15 ml) sterile e da centrifuga per la esecuzione della prova di emoagglutinazione rapida.

### **Prova di emoagglutinazione rapida**

- In condizioni di sterilità prelevare una piccola aliquota di liquido allantoideo e porlo sulla piastra.
- Aggiungere al campione una goccia di sospensione di globuli rossi all'1%.
- Con movimento rotatorio della piastra mescolare le due componenti.
- Dopo 2 minuti di reazione verificare presenza o assenza di attività emoagglutinante.

**Presenza di attività emoagglutinante:** i globuli rossi verranno agglutinati formando dei granellini visibili ad occhio nudo, il campione viene considerato sospetto positivo per virus influenzali aviari e si procede con la successiva fase di emoagglutinazione lenta per il calcolo del titolo emoagglutinante della sospensione virale per il successivo test di inibizione dell'emoagglutinazione.

**Assenza di attività emoagglutinante:** i globuli rossi rimangono in sospensione, precipitando sul fondo della piastra dopo circa 3 - 4 minuti. Il campione viene considerato negativo e verrà sottoposto al secondo passaggio.

**Nota:** reazioni aspecifiche di emoagglutinazione rapida si possono sviluppare per contaminazione batterica del liquido allantoideo, in caso di sospetta contaminazione filtrare il campione originario e ripetere la procedura.

In caso di sospetta contaminazione batterica del campione il dirigente responsabile o un suo delegato può richiedere l'esecuzione di un esame batteriologico in Agar Sangue *Medium* AS (scelta opzionale).

### **Inoculazione, incubazione e speratura delle uova embrionate (secondo passaggio)**

- In caso di assenza di mortalità embrionale durante il primo passaggio si procede allo stoccaggio delle uova tra +2°C e +8°C per una intera notte per l'esecuzione del secondo passaggio cieco.
- Procedere con il secondo passaggio in nuove uova SPF di 9 - 11 giorni, utilizzando come inoculo il liquido allantoideo fluido e non diluito raccolto dalle uova del primo passaggio.
- Incubare le uova in termostato a +37°C per la durata di altri sei giorni.
- Sperare le uova giornalmente (modulo **DSBIO MOD 007**).
- In caso di mortalità embrionale o embrioni moribondi procedere come descritto precedentemente alla prova di emoagglutinazione rapida.
- Annotare l'esito del secondo passaggio sul modulo **DSBIO MOD 007**.

**Nota:** In particolari condizioni (esempio: animali in attesa di essere avviati alla macellazione e risultati positivi al test rapido (PCR) per la ricerca dell'antigene influenzale di tipo A) ed in caso di emergenze epidemiche il responsabile del laboratorio o un suo delegato può autorizzare passaggi in uova SPF della durata di tre giorni ciascuno, dimezzando le tempistiche di isolamento.

### **Prova di emoagglutinazione lenta e calcolo del titolo emoagglutinante della sospensione virale e delle 4 HAU (Unità emoagglutinanti)**

- Secondo quanto schematizzato in figura 1, distribuire 25 µl di soluzione di PBS partendo dalle prime due righe e A e B della piastra.
- Distribuire 50 µl di PBS per pozzetto nella terza riga C per allestimento "controllo globuli".

- Aggiungere, nei primi pozzetti (A1 e B1) delle prime due righe, 25 µl di sospensione virale da tipizzare e diluirlo per raddoppio fino ai pozzetti A12 e B12
- Eliminare gli ultimi 25 µl.
- Distribuire 25 µl di PBS nelle righe A e B.
- Aggiungere, in tutti i pozzetti 25 µl di una sospensione di globuli rossi di pollo 1%
- Agitare delicatamente la piastra e porla tra +2°C e +8°C per un'ora oppure a temperatura ambiente per 30 - 40 minuti fino a quando i globuli rossi di controllo non siano completamente sedimentati sul fondo dei pozzetti a formare un bottone.

La lettura della prova si effettua inclinando la piastra di circa 90°, l'emoagglutinazione (esito positivo) si manifesta con la presenza di un reticolo sul fondo del pozzetto, che impedisce ai globuli rossi sedimentati di scorrere verso il basso assumendo una forma di goccia. Nei pozzetti che presentano il fenomeno, i globuli rossi agglutinati rimangono adesi al fondo del pozzetto. L'assenza del fenomeno dell'emoagglutinazione (esito negativo) si manifesta con un movimento di globuli rossi sedimentati, sovrapponibile a quello che si osserva nei pozzetti controllo globuli.

Il titolo emoagglutinante della sospensione virale corrisponde alla sua diluizione più elevata con evidente e mantenuta attività di emoagglutinazione.

Tale diluizione è considerata contenere una unità emoagglutinante (1 HAU). Poiché per la successiva tipizzazione H1-H16 mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione sono necessarie 4 HAU si utilizzerà la diluizione della sospensione virale che contiene quattro volte quella concentrazione virale (esempio: se si ottiene un titolo emoagglutinante pari a 1:512 (1 HAU), le 4 HAU si avranno alla diluizione virale di 1:128 (512:4=128).

Registrare il risultato sul foglio di lavoro "DSBIO MOD 005 - Scheda registrazione dati per prova di titolazione/emoagglutinazione" o analogo modulo di struttura.

**Figura 1:** Inibizione dell'emoagglutinazione con pannello di antisieri di riferimento anti H1-H16

		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Campione	A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Campione	B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Controllo globuli	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O



### **Tipizzazione preliminare mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione con sieri policlonali anti H1-H16**

Quando un campione di liquido allantoideo presenta attività emoagglutinante si procede alla tipizzazione antigenica della emoagglutinina utilizzando a discrezione del dirigente un pannello di sieri di riferimento influenzali e anti-NDV, mediante test dell'inibizione dell'emoagglutinazione. Per l'esecuzione di questa prova è necessario lavorare con una sospensione virale a titolo emoagglutinante noto. Per tale fine si riporta in figura 1 la procedura di calcolo del titolo emoagglutinante e calcolo delle 4 HAU.

### **Inibizione dell'emoagglutinazione con sieri di riferimento**

- Per ogni campione, se si decide di utilizzare il pannello di antisieri completo (H1-H16) disporre tre piastre come indicato nelle figure 2 e 3.
- Distribuire, nella prima e nella seconda piastra, 25 µl di soluzione di PBS in tutti i pozzetti e nella terza piastra distribuire 25 µl di PBS nelle prime tre righe orizzontali. La riga C della terza piastra verrà utilizzata per il controllo siero negativo di riferimento (Fig. 4).
- L'ultima riga di ogni piastra verrà utilizzata per il controllo delle 4 HAU virali e per il controllo globuli.
- Porre, nella riga H di ciascuna piastra, 25 µl di PBS da H2 a H12; tale riga sarà utilizzata per effettuare il controllo dei globuli rossi e delle 4 HAU virali (fig. 1, 2 e 3).
- Aggiungere nel primo pozzetto della prima riga orizzontale 25 µl di siero di riferimento anti-H1, 25 µl di siero anti-H2 nella seconda e così via, seguendo lo schema riportato. Nel primo pozzetto della terza riga della terza piastra depositare 25 µl di siero negativo.
- Diluire i sieri per raddoppio fino all'ultimo pozzetto della riga.
- Eliminare gli ultimi 25 µl.
- Diluire il liquido allantoideo contenente il virus da tipizzare in soluzione di PBS, in modo da avere 4 HAU in 25 µl e mantenerlo a temperatura di refrigerazione fino alla fine della prova.
- Aggiungere 25 µl del liquido allantoideo (4 HAU) in tutti i pozzetti della prima piastra della seconda (righe A-G) e nelle prime tre righe della terza piastra (A-C).
- Nelle righe H di ciascuna piastra aggiungere 25 µl del liquido allantoideo solo nei primi due pozzetti (H1-H2, quindi diluire per raddoppio partendo dal pozzetto H2 fino al pozzetto H6 ed eliminare gli ultimi 25 µl.
- Aggiungere in tutte le righe H di ciascuna piastra 25 µl di PBS. Nei primi 6 pozzetti si otterrà il controllo virus delle 4 HAU (CV) e negli altri 6 si otterrà il controllo dei globuli rossi (CG).
- Agitare delicatamente la piastra e tenerla tra +2°C e +8°C per 60 minuti oppure a temperatura ambiente per 30 minuti.
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 µl di globuli rossi di pollo all'1%.
- Agitare delicatamente la piastra e riporla tra +2°C e +8°C oppure a temperatura ambiente per 30-40 minuti, finché i globuli rossi di controllo non siano sedimentati sul fondo dei pozzetti a formare un bottone.

**Nota:** Il dirigente di Laboratorio o un suo delegato può far eseguire la prova utilizzando un pannello ristretto di sieri in base a sospetti diagnostici, alla situazione epidemiologica e a stati emergenziali epidemici.

**Figura 2:** Prima piastra

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Siero riferimento H1	A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H2	B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H3	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H4	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H5	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H6	F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H7	G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Controlli													
H1-H6 controllo virus	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H7-H12 controllo globuli													

**Figura 3.** Seconda piastra

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Siero riferimento H8	A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H9	B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H10	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H11	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H12	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H13	F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero riferimento H14	G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Controlli													
H1-H6 controllo virus	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
H7-H12 controllo globuli													



### Letture delle piastre

- La lettura si effettua tenendo la piastra in posizione inclinata ed osservando se, e fino a quale diluizione uno dei sieri di riferimento inibisce l'attività emoagglutinante del virus ovvero fino a quale diluizione del siero vi è la formazione di gocce che "scorrono" alla stessa velocità di quelle formatesi nei pozzetti dei globuli rossi di controllo (pozzetti H7-H12).

**Nota:** In caso di sospetto o conferma di positività per sottotipi influenzali H5 e H7 contattare prontamente il responsabile di laboratorio o un suo delegato per la valutazione delle positività e l'iter diagnostico da intraprendere per la caratterizzazione del patotipo LPAI/HPAI ed eventuali prove di patogenicità *in vivo*.

### Test dell'indice di patogenicità intravenosa (IVPI) *in vivo* e valutazione dei risultati

- Effettuare la richiesta di pulcini di sei settimane (SPF) secondo le modalità descritte nel processo "PR GSTAB - Processo Gestione dello Stabulario", utilizzando l'apposito spazio nella intranet.
- Preparare in soluzione fisiologica isotonica sterile una diluizione 1:10 di liquido allantoideo infetto fresco con un titolo HA maggiore di 1:16 preferibilmente dal primo isolamento.
- Per l'accesso allo stabilimento utilizzatore assegnato per la prova, attenersi alle disposizioni operative specifiche descritte nel processo PR GSTAB.
- Iniettare per via endovenosa 0,1 ml del virus diluito in ciascuno dei 10 pulcini di sei settimane esenti da organismi patogeni specifici (SPF) o sieronegativi
- Esaminare i volatili ogni 24 ore per 10 giorni e registrare i dati nel modulo "DSBIO MOD 118 - Scheda registrazione dati IVPI" o analogo modulo di struttura (vedi Fig.4).
- Attribuire ad ognuno dei volatili per ogni osservazione il loro stato clinico per ogni giornata di osservazione:  
Normale = 0  
Malato = 1  
Gravemente malato = 2  
Morto = 3

La classificazione dei volatili malati e gravemente malati si basa su una valutazione clinica soggettiva.

Di solito i volatili «malati» presentano uno dei segni clinici elencati di seguito, mentre quelli «gravemente malati» ne presentano più di uno:

- Compromissione respiratoria
- Depressione
- Diarrea
- Cianosi cutanea o del bargiglio
- Edema dei seni, della faccia e/o della testa
- Segni neurologici

**Nota:** Ai volatili morti assegnare il punteggio 3 in occasione di ogni osservazione giornaliera successiva alla morte. Gli animali moribondi e non in grado di alimentarsi e abbeverarsi autonomamente devono essere sacrificati umanamente tramite pratica eutanassica, secondo quanto descritto in istruzione "IZS IDD 132 - Soppressione degli animali da laboratorio utilizzati a fini scientifici nello stabulario" del processo PR GSTAB, questi saranno classificati come morti all'osservazione successiva, in quanto destinati a morire entro 24 ore senza intervento.

L'IVPI è il punteggio medio per volatile in rapporto a un'osservazione effettuata su un arco di 10 giorni. Un indice di patogenicità intravenosa pari a 3,00 significa che tutti i

volatili sono morti entro 24 ore, mentre un indice pari a 0,00 indica che nessun volatile ha evidenziato segni clinici durante il periodo di osservazione di 10 giorni. L'esempio che segue in fig. 4, mostra un metodo semplice di registrazione dei risultati e di calcolo degli indici.

**Figura 4.** Schema di registrazione del test IVPI

Segni clinici	Giorni successive alla inoculazione E.V.										Punteggio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Normale	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 X 0 = 0
Malato	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 X 1 = 6
Gravemente malato	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 X 2 = 12
Morto	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 X 3 = 228
Punteggio totale = 246/100*											
IVPI = 2.46											

**Note:**

10 volatili osservati per 10 giorni = 100 osservazioni (\*)

Indice = punteggio totale per numero di osservazioni 246/100 = 2,46

**N.B. Qualsiasi virus influenzale di tipo A, indipendente dal sottotipo è considerato un virus HPAI qualora presentasse un IVPI superiore a 1,2**

### 8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

Parametro	Risultati attesi	Azione in caso NC
Controllo delle HAU/controllo virus	4 Attività emoagglutinante nei primi 3 pozzetti (rispettivamente 4, 2 ed 1 HAU), emoagglutinazione parziale nel quarto pozzetto (0.5 HAU) e assenza di emoagglutinazione negli ultimi due pozzetti	Qualora i controlli non dovessero fornire i risultati attesi, deve essere contattato il responsabile di laboratorio o un suo delegato il quale fornirà indicazioni sulle azioni da intraprendere e valuterà la validità o meno della prova. Nel caso in cui la prova non sia considerata valida sarà necessario ripeterla.
Controllo globuli in HA e HI	Nei pozzetti non si deve osservare attività emoagglutinante	
Siero di riferimento negativo	Non si deve osservare inibizione della emoagglutinazione o comunque non oltre la diluzione 1:8	
Siero di riferimento positivo	Si deve osservare inibizione della emoagglutinazione	

## 8.2 Espressione dei risultati

### 8.2.1 Isolamento in uova, Emoagglutinazione rapida e inibizione Emoagglutinazione

CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE	RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO	RISULTATO ESPRESSO SUL RDP
Due passaggi ciechi in uova embrionate di pollo SPF in assenza di mortalità e di attività emoagglutinante in liquido allantoideo	NEGATIVO	NEGATIVO
Liquido allantoideo con attività emoagglutinante, ma negativo al test di inibizione dell'emoagglutinazione con pannello di antisieri (H1-H16), è da considerarsi negativo per ricerca influenza virus. Il dirigente può eventualmente decidere di procedere ad ulteriori approfondimenti diagnostici per la diagnosi differenziale (esempio: Paramyxovirus aviari) inserendo nella medesima seduta di HI un anti siero di riferimento per NDV (opzionale)	NEGATIVO	NEGATIVO
Liquido allantoideo con attività emoagglutinante e positivo al test di inibizione dell'emoagglutinazione con pannello di antisieri (H1-H16), è da considerarsi positivo per ricerca influenza virus tipo A	POSITIVO	POSITIVO
Tipizzazione dell'emoagglutinina (H) Liquido allantoideo che testato con pannello di antisieri (H1-H16) tramite test di inibizione dell'emoagglutinazione ne permette la tipizzazione	POSITIVO SOTTOTIPO H	POSITIVO VIRUS INF. SOTTOTIPO H

### 8.2.2 IVPI

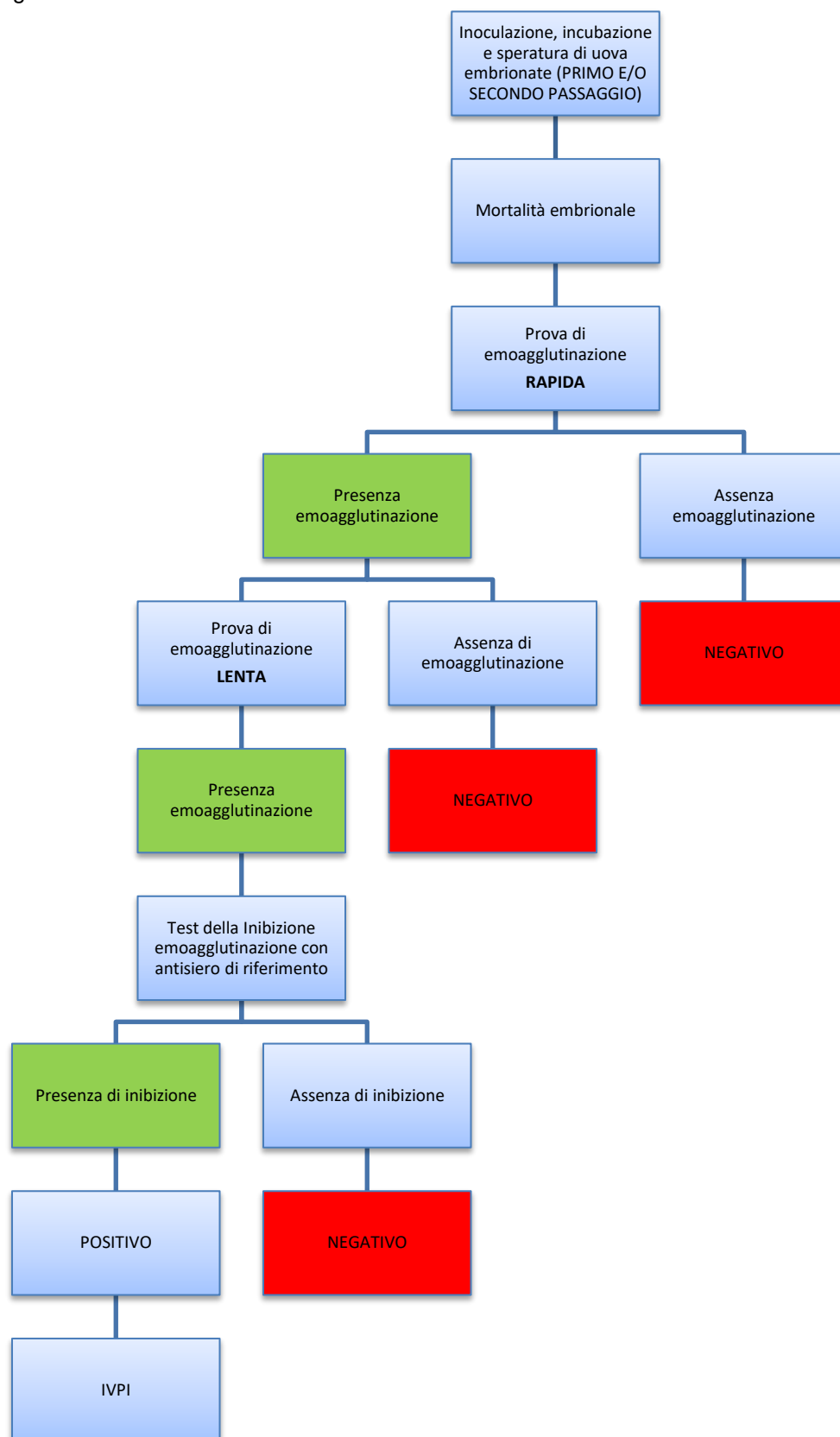
CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE	RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO	RISULTATO ESPRESSO SUL RDP
La patogenicità in vivo viene valutata mediante l'esecuzione del test dell'indice di patogenicità intravenosa (IVPI)	EFFETTUATO L'INDICE DI PATOGENICITA' INTRAVENOSO RISULTA ESSERE..." (indicare il valore ottenuto dalla tabella di calcolo fig. 4)	EFFETTUATO L'INDICE DI PATOGENICITA' INTRAVENOSO RISULTA ESSERE..." (indicare il valore ottenuto dalla tabella di calcolo fig. 4)

Il bordo delle tabelle evidenziato in rosso indica le colonne il cui contenuto è riportato nel rapporto di prova.

Vedi diagramma di flusso sotto riportato (figura 5).

In ogni caso l'interpretazione finale del risultato e le operazioni conseguenti da intraprendere sono demandate ad un dirigente del laboratorio oppure (in assenza di questi) ad altro dirigente dell'IZS con delega di firma sui rapporti di prova.

**Figura 5:** Diagramma di flusso



## 9. Sanificazione degli ambienti/attrezzature di lavoro e gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Sanificare gli ambienti di lavoro secondo l'istruzione "IZS IDD 222 - Sanificazione di attrezzature e superfici nei laboratori e sale necroscopiche" e le attrezzature utilizzate secondo le specifiche del costruttore o documenti inerenti, presenti in WebQuality.

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, secondo il processo "PR 09 – Gestione dei rifiuti", fare riferimento alle seguenti istruzioni di dettaglio:

- **IZS IDD 274** – Elenco dei rifiuti, specifico di laboratorio;
- **IZS IDD 305** – Istruzioni specifiche per la gestione di determinate tipologie di rifiuti.

## 10. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
10	11.05.22	Revisione del metodo a seguito entrata in vigore dell'AHL e decadenza delle normative precedentemente adottate. Il metodo di riferimento indicato non cambia le modalità operative; aggiornamento documenti processo rifiuti e correzioni formali	Dr.ssa A. Costa V. Brasola	Dr.ssa P. Carnieletto Dr. C. Terregino	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
11	24.03.23	Revisione per eliminazione riferimento al par B 1.1 del Manuale OIE, aggiornamenti formali e inserimento diagramma di flusso	Dr.ssa F. Gobbo A. Costa	Dr.ssa P. Carnieletto Dr. C. Terregino	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
12	18.04.2024	Revisione formale della descrizione del metodo per cambio acronimo da OIE a WOA	Dr.ssa L. Guerra Dr.ssa P. Perini	Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli