

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrici	Tecnica di prova
Virus influenzali aviari	Liquido allantoideo, organi, tamponi d'organo e feci di specie aviare	Isolamento in uova embrionate e tipizzazione

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- Decisione commissione 2006/437/CE che approva un manuale diagnostico per l'influenza aviaria secondo quanto previsto dalla direttiva 2005/94/CE del Consiglio.

Bibliografia di riferimento:

- DPR 656/96 "Regolamento per l'attuazione della direttiva 92/40/CEE che istituisce misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria";
- OIE Manual for Terrestrial Animals Cap 3.3.4, 2021 - *Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses)*;
- Ministero della Salute. Piano Nazionale di Sorveglianza per l'Influenza aviaria vigente;
- Spackman et al., 2013. BMC Vet Res. 22; 9:35. Doi: 10.1186/1746-6148-9-35);

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, secondo la istruzione DSBIO IOP 058 "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 4-6 settimane	Commerciale	Non Applicabile
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 "IZS IDD 146 - Preparazione di sospensioni di globuli rossi di specie aviare".

5. Verifiche da effettuare prima di iniziare la prova

Requisiti del campione secondo "DSBIO IOP 006 - Manipolazione campioni presso i Laboratori e U.O. SCS5 e SCS6".

6. Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Conservare il campione secondo "DSBIO IOP 006" ed "IZS IDD 007 – Modalità di conservazione dei campioni".

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	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

8. Modalità operative

PREPARAZIONE CAMPIONE	<p>Tamponi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contrassegnare la provetta con il numero di registro del campione. • Compilare il rispettivo foglio di lavoro “DSBIO MOD 007 - Scheda registrazione dati per prova di isolamento virale su uova”. • Se il tampone animale è già immerso in soluzione di PBS antibiotata (1 ml circa), si può proseguire con le successive fasi all'isolamento. In caso contrario il campione può essere diluito quanto basta con ulteriore soluzione di PBS antibiotata e refrigerata (volume finale 1 ml). • Lasciare agire il campione con la soluzione di PBS antibiotata per almeno 1-2 ore a temperatura ambiente. • Centrifugare il campione a 1000 x g per 10 minuti a temperatura tra +2°C e +8°C trasferire il surnatante in una nuova provetta sterile (inoculo per uova SPF). • In particolari condizioni, ad esempio in caso di emergenze epidemiche il dirigente di Laboratorio o un suo delegato 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. • 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. • In condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare, utilizzare il surnatante per infettare le uova embrionale di pollo SPF (9-11 giorni di incubazione) come descritto successivamente in “Esecuzione dell'analisi”. <p>Organi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lasciare scongelare gli organi a temperatura ambiente oppure tra +2°C e +8°C. • Contrassegnare con il numero di registro del campione una provetta sterile da centrifuga 15 ml e compilare il rispettivo “DSBIO MOD 007”. • In condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare, prelevare una quantità di campione paragonabile ad un cubo di un circa 1 cm³ 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.
- Omogenizzare il campione in un mortaio sterile con l'aggiunta di sabbia di quarzo sterile.
 - Aggiungere 9 ml di soluzione di PBS antibiotata.
 - Raccogliere l'omogenato in una provetta 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 trasferire il surnatante in una nuova provetta sterile (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 successivamente in "Esecuzione dell'analisi".

Feci

- Contrassegnare con il numero di registro del campione una provetta sterile da centrifuga 15 ml e compilare il rispettivo "DSBIO MOD 007".
- In condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare, 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 trasferire il surnatante in una nuova provetta sterile (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 successivamente in "Esecuzione dell'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 "Esecuzione dell'analisi").

PREDISPOSIZIONE CONTROLLI

Diversi controlli di processo sono inclusi nelle varie fasi di questa procedura di prova. La seduta di prova si considera valida se i seguenti controlli di processo forniscono i risultati attesi:

- **Controllo globuli in HA e HI:** nei pozzetti non si deve osservare attività emoagglutinante.
- **Controllo delle 4 UHA/controllo virus:** attività emoagglutinante nei primi 3 pozzetti (rispettivamente 4, 2 ed 1 UHA), emoagglutinazione parziale nel quarto pozzetto (0.5 UHA) e assenza di emoagglutinazione negli ultimi due pozzetti.
- **Controllo siero riferimento negativo:** non si deve osservare inibizione della emoagglutinazione o comunque non oltre la diluizione 1:8.

**ESECUZIONE
ANALISI**

Inoculazione, incubazione e speratura delle uova embrionate

- Preparare per ogni campione almeno 4 uova SPF al 9°-11° giorno di incubazione per l'inoculazione in cavità allantoidea, contrassegnarle con il numero di registro corrispondente e compilare il foglio di lavoro "**DSBIO MOD 007**".
- Su ogni uovo praticare un foro con il punteruolo al di sopra della linea che delimita la camera d'aria.
- Con una siringa da 1 ml inoculare 0.1 ml-0.2 ml di materiale in esame in cavità allantoidea di ciascun uovo.
- Sigillare le uova con colla atossica ed incubarle in termostato a +37°C per la durata di sei giorni (primo passaggio)
- Sperare le uova giornalmente per la valutazione della vitalità embrionale e registrare i risultati sul "**DSBIO MOD 007**".
- Le uova contenenti embrioni morti o morenti entro la sesta giornata dall'inoculazione devono essere aperte in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare, previo stoccaggio delle uova a temperatura di refrigerazione tra +2°C e +8°C per almeno 4 ore.
- Aprire la parte del guscio sopra la camera d'aria con forbici sterili, raccogliere con una pipetta sterile fino a 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.
- 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.
- Rimuovere le uova dal frigo e come precedentemente descritto aprire le uova per la raccolta del liquido allantoideo da sottoporre alla prova di emoagglutinazione rapida come sopra descritto.
- Annotare l'esito del primo passaggio sul foglio di lavoro "**DSBIO MOD 007**" 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 (secondo passaggio).
- Sperare le uova giornalmente per la valutazione della vitalità embrionale e registrare i risultati sul "**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 "**DSBIO MOD 007**".
- Se dopo due passaggi ciechi in uova embrionate di pollo SPF non si evidenzia alcun embrione morto/moribondo con liquido allantoideo presentante attività emoagglutinante per globuli rossi di pollo 1%, il risultato della prova è considerato "**NEGATIVO**" e viene espresso sul rapporto di prova come "Negativo per influenza aviare".

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 rapida

- In condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare prelevare con una pipetta una piccola aliquota di liquido allantoideo e porlo sulla piastra Petri.

- 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 emoagglutinate.

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 tipizzazione dell'emoagglutinina attraverso il pannello di sieri policlonali anti H1-H16 tramite metodica dell'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 (membrane filtranti 0,45 µm) 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).

Tipizzazione preliminare mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione con sieri policlonali

Quando un campione di liquido allantoideo presenta attività emoagglutinante si procede alla tipizzazione antigenica della emoagglutinina utilizzando un pannello di sieri di riferimento anti H1-H16, 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.

Calcolo del titolo emoagglutinante della sospensione virale e calcolo delle 4 HAU

- Preparare una piastra da microtitolazione fondo a V a 96 pozzetti contrassegnata con il numero di registro del campione in esame e compilare il rispettivo foglio di lavoro "DSBIO MOD 008 - Scheda registrazione dati per prova di tipizzazione virale inibizione dell'emoagglutinazione".
- 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 UHA). Poiché per la successiva tipizzazione H1-H16 mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione sono necessarie 4 UHA 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 UHA), le 4 UHA 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”.

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
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

- Per ogni campione, se si decide di utilizzare il pannello di antisieri completo (H1-H16) disporre tre piastre da microtitolazione a fondo V a 96 pozzetti in posizione orizzontale come indicato nella figura 2,3 e 4.
- 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 UHA 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 UHA 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 UHA in 25 µl e mantenerlo a temperatura di refrigerazione fino alla fine della prova.
- Aggiungere 25 µl del liquido allantoideo (4 UHA) 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 UHA (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	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Siero riferimento H2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Siero riferimento H3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Siero riferimento H4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Siero riferimento H5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Siero riferimento H6	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Siero riferimento H7	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Controlli													
H1-H6 controllo virus	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
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).
- La seduta di prova si considera valida se i seguenti controlli di processo, controllo virus, controllo globuli e controllo siero negativo forniscono i risultati attesi.
Controllo delle 4 UHA/controllo virus: attività emoagglutinante nei primi 3 pozzetti (rispettivamente 4, 2 ed 1 UHA), emoagglutinazione parziale nel quarto pozzetto (0.5 UHA) e assenza di emoagglutinazione negli ultimi due pozzetti
Controllo globuli: nei pozzetti non si deve osservare attività emoagglutinante
Controllo siero riferimento negativo: non si deve osservare inibizione della emoagglutinazione o comunque non oltre la diluizione 1:8
- 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 necessaria ripeterla.

Il campione si considera **POSITIVO** se l'attività emoagglutinante del virus isolato viene inibito ad una diluizione uguale, un logaritmo superiore o un logaritmo inferiore al titolo omologo del siero di riferimento in esame (H1-H16).

- Il campione si considera **NEGATIVO** se l'attività emoagglutinante del virus isolato non viene inibita da uno dei sieri positivi di riferimento (H1-H16).
- Registrare il risultato sul “**DSBIO MOD 008**”.

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 uguale o maggiore di 1:16 preferibilmente dal primo isolamento e senza alcuna selezione.
- Per l'accesso allo stabilimento utilizzatore assegnato per la prova, attenersi alle disposizioni operative specifiche descritte nel “**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 “**DSBIO MOD 118** - Scheda registrazione dati IVPI” (vedi Fig.4).
- Classificare ognuno dei volatili ad ogni osservazione nel modo seguente:
0 = Normale
1 = Malato
2 = Gravemente malato
3 = Morto

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 “**IZS IDD 132** - Soppressione degli animali da laboratorio utilizzati a fini scientifici nello stabulario” del **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. 5, 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

Per ogni seduta di prova e per le varie metodiche elencate sono previsti dei controlli di processo a validità della corretta esecuzione della procedura di prova in ogni suo passaggio.

8.2 Espressione dei risultati

I risultati vengono espressi con le seguenti modalità:

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. Si può 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	POSITIVO	POSITIVO

test di inibizione dell'emoagglutinazione con pannello di antisieri (H1-H16), è da considerarsi positivo per ricerca influenza virus tipo A		
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
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...".	EFFETTUATO L'INDICE DI PATOGENICITA' INTRAVENOSO RISULTA ESSERE...".

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

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.

9. Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento al dedicato allegato "IZS ALL 006 (IZS IO 033) - Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di tipo sierologico".

10. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
07	21.04.2015	Revisione generale	Dr. C. Terregino	Dr.ssa P. Carnieletto Dr. G. Cattoli	Direttore Sanitario Dr. S. Marangon
08	21.01.21	Cambio layout e revisione modalità operative	Dr.ssa F. Gobbo Sig.ra I. Castaldello	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa R. Quartesan	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
09	12.08.21	Aggiornamento bibliografico e del capitolo 7	Dr. C. Terregino V. Brasola	Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli