

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Virus della Malattia di Newcastle (NDV)	Liquido allantoideo, surnatante cellulare, organi o tamponi o feci di specie aviare	Isolamento in uova embrionate

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- DPR 657/96 GU n. ° 300 del 23/12/1996 All. III cap. 1-2-3-5-6-7

Bibliografia di riferimento:

- Direttiva 92/66/CEE del Consiglio del 14/07/1992 che istituisce misure comunitarie di lotta contro la malattia di *Newcastle*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee N.L. 260/1 del 05.09.1992
- OIE Manual for Terrestrial Animals, Cap 3.3.14 2021 - *Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus)*.

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR007V.

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	+2°C e +8°C
Polli SPF di 1 giorno	Commerciale	Non Applicabile
Sabbia di quarzo	Commerciale	T.A.
Siero policlonale di riferimento anti-NDV	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"	+2°C e +8°C o ≤ -18°C
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 secondo "**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. 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 e +8°C trasferire il surnatante in un nuovo 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 <i>pool</i> 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 in fine 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 un nuovo 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".
<p>PREPARAZIONE CAMPIONE</p>	<p>Feci</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 ed 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 di refrigerazione e trasferire il surnatante in un nuovo 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. <p>Liquido allantoideo/surnatante di colture cellulari 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 di riferimento anti NDV (vedi "Esecuzione dell'analisi").</p>

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 o smalto 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 e 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 e 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 a +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 "**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;
- Incubarle 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 di isolamento in uova embrionale SPF è considerato **“NEGATIVO”**.

Nota: In particolari condizioni (esempio: 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 fare 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 (scelta opzionale).

Tipizzazione preliminare mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione con siero policlonale

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 di registrazione dati per prova tipizzazione virale inibizione dell'emoagglutinazione”**.
- Secondo quanto schematizzato in figura 1, distribuire 25 µl di soluzione di PBS partendo dalle prime due righe A e B della piastra.
- Distribuire 50 µl di PBS per pozzetto nella terza riga a 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 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 "**DSBIO MOD 005** - Scheda registrazione dati per prova di titolazione/emoagglutinazione".

Figura 1. Piastra per calcolo del titolo emoagglutinante

		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

Inibizione dell'emoagglutinazione con siero di riferimento anti NDV

- Per ogni campione con attività emoagglutinante predisporre una piastra da microtitolazione a fondo V a 96 pozzetti in posizione, come indicato nella figura 2.
- Distribuire 25 µl di soluzione di PBS in tutti i pozzetti delle tre prime righe orizzontali (A, B, C) e nella riga D, escluso il primo pozzetto (D1).
- La riga C della piastra verrà utilizzata per il siero di riferimento negativo.
- La riga D della piastra verrà utilizzata per il controllo virus (4 UHA) e il controllo globuli.
- Aggiungere nel primo pozzetto delle righe A e B 25 µl di siero di riferimento anti NDV.
- Aggiungere nel primo pozzetto della riga C 25 µl di siero di riferimento negativo.
- Diluire i sieri delle righe A, B, C per raddoppio fino all'ultimo pozzetto della riga
- Eliminare gli ultimi 25 µl.
- Aggiungere 25 µl del liquido allantoideo (4 UHA) in tutti i pozzetti delle righe A, B e C e nel primo e secondo pozzetto della riga D, quindi diluire per raddoppio partendo dal pozzetto D2 fino al pozzetto D6 eliminando gli ultimi 25 µl.
- Aggiungere in tutti i pozzetti della riga D 25 µl di PBS.
- 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 per un'ora 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.

Figura 2. Piastra per tipizzazione di APMV-1

	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

Siero di riferimento anti APMV-1	A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero di riferimento anti APMV-1	B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Siero di riferimento negativo	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Controllo virus (D1-D6)												
Controllo globuli (D7-D12)	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

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 D7-D12);
- 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 anti NDV in esame;

- Il campione si considera **NEGATIVO** se l'attività emoagglutinante del virus isolato non viene inibita dal del siero di riferimento anti NDV in esame;
- Registrare il risultato sul "**DSBIO MOD 008**".

Nota: In caso di sospetto o conferma di positività per virus APMV-1 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 (velogeno, mesogeno, lentogeno) ed eventuali prove di patogenicità *in vivo* per le popolazioni domestiche.

Test dell'indice di patogenicità intracerebrale (ICPI) in pulcini SPF di 1 giorno

N.B. questo test deve essere eseguito obbligatoriamente con isolati virali provenienti da specie domestiche e secondo la normativa vigente sono soggetti a denuncia esclusivamente i focolai sostenuti da virus con indice di patogenicità intracerebrale > 0,7.

Il test può essere richiesto anche per isolati virali provenienti da avifauna selvatica in caso di episodi di mortalità anomala o in caso di isolamento di ceppi di AMPV-1 differenti da quelli endemici nelle popolazioni di columbiformi selvatici

- Effettuare la richiesta di pulcini di 1 giorno (SPF) secondo le modalità descritte nel processo “**PR GSTAB** - 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 0,05 ml del virus diluito per via intracerebrale in 10 pulcini di un giorno (SPF).
- Esaminare i volatili ogni 24 ore per 8 giorni post infezione e registrare i dati nel “**DSBIO MOD 027** - Scheda registrazione dati ICPI” (vedi Fig.3)
- Classificare ognuno dei volatili ad ogni osservazione nel modo seguente:
0 = Normale
1 = Malato
2 = Morto

Nota: Ai volatili morti assegnare il punteggio 2 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 eutanasica, secondo quanto descritto in “**IZS IDD 132** - Soppressione degli animali da laboratorio utilizzati a fini scientifici nello stabulario”, e “**PR GSTAB**”, questi saranno classificati come morti all'osservazione successiva, in quanto destinati a morire entro 24 ore senza intervento.

L'ICPI è il punteggio medio per volatile in rapporto a un'osservazione effettuata su un arco di 8 giorni. L'esempio che segue in fig. 3, mostra un metodo semplice di registrazione dei risultati e di calcolo degli indici.

Figura. 3. Schema di registrazione del test ICPI

Stato clinico	Giorno di osservazione post infezione								Punteggio
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Normale	10	4	0	0	0	0	0	0	14 X 0 = 0
Malato	0	6	10	4	0	0	0	0	20 X 1 = 20
Morto	0	0	0	6	10	10	10	10	46 X 2 = 92

Punteggio totale = 112/80* ICPI = 1.4										
<p>Note: 10 volatili osservati per 8 giorni = 80 osservazioni (°). Indice = punteggio totale per numero di osservazioni 112/80 = 1,4.</p> <p>*Ai sensi della normativa del DPR 657/96 GU n°300 del 23/12/1996 per malattia di <i>Newcastle</i> si intende un'infezione dei volatili causata da un ceppo aviare del <i>Paramyxovirus 1</i> con un indice di patogenicità intracerebrale (ICPI) superiore a 0.7 nei pulcini di un giorno.</p>										

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:

CONDIZIONI 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 antisiero di riferimento per NDV, è da considerarsi negativo per AMPV-1. Si può procedere ad ulteriori approfondimenti diagnostici per la diagnosi differenziale (esempio: influenza virus aviari) inserendo nella medesima seduta di HI anti sieri di riferimento per AI (opzionale)	NEGATIVO	NEGATIVO
Liquido allantoideo con attività emoagglutinante e positivo al test di inibizione dell'emoagglutinazione con antisiero di riferimento per NDV, è da considerarsi positivo per ricerca AMPV-1. A	POSITIVO	POSITIVO
La patogenicità in vivo viene valutata mediante l'esecuzione del test dell'indice di patogenicità intracerebrale (ICPI) in pulcini SPF di 1 giorno	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
06	22.02.13	Allineamento normativo per adeguamento alla domanda di accreditamento	Dr. C. Terregino	RQ-Dr. A. Cereser Dr. S. Nardelli	Direttore Sanitario Dr. S. Marangon
07	20.01.2021	Cambio layout e revisione modalità operative	Dott.ssa F. Gobbo I. Castaldello	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa R. Quartesan	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
08	12.08.21	Aggiornamento bibliografico e del capitolo 7	Dr. C. Terregino V. Brasola	Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli