

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Ricerca anticorpi nei confronti dell'antigene di gruppo specifico dei virus influenzali di tipo A	Siero di sangue di specie aviare*	Agar gel immuno-diffusione (AGID)

*Non si applica ai sieri degli anseriformi, in quanto questi volatili hanno una scarsa produzione di anticorpi precipitanti.

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap. 3.3.4 par. B.2.2 2025

Bibliografia di riferimento:

- WOAH, Manual for Terrestrial Animals, Cap. 3.3.4, par. B.2.2, 2025 - *Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses)*.
- Decisione commissione 2006/437/CE che approva un manuale diagnostico per l'influenza aviaria secondo quanto previsto dalla direttiva 2005/94/CE del Consiglio
- Beard C.W. 1970. Demonstration of type specific antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion Bull. W.H.O. 42: 779 - 785
- Decreto legislativo 25 gennaio 2010, n.9
- Spackman E., 2020, Animal Influenza Virus, Human Press. Chapter 13 Agar Gel Immunodiffusion Assay to detect antibodies to Type A Influenza Virus. pag 165 - 175

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. IMM 063 V

3. Attrezzature, apparecchiature e consumabili

Dotazione base di un laboratorio di sierologia (**ALL PDP 279 A** - Apparecchiature, reagenti, attrezzature e materiali consumabili per immunologia) con le seguenti integrazioni e/o specifiche:

- Bilancia tecnica da 0 a 150 g
- Bottiglia da 250 ml con tappo
- Camera umida: può essere costituita da una vaschetta con coperchio con all'interno della carta imbevuta d'acqua
- Forno a microonde
- Piastre Petri da 90 mm di diametro
- 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

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

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

Prodotto	Fornitore/Specifiche	Conservazione
Antigene per gel-diffusione	Fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6	≤ -18°C (liofilizzati) o a ≤ -70°C (in forma liquida)
Siero positivo di referenza	Fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6	≤ -18°C

Acqua distillata	Commerciale	Temperatura ambiente
------------------	-------------	----------------------

4.1 Preparazione delle soluzioni - Preparazione delle piastre di agar

- Misurare in un cilindro graduato 100 ml di acqua distillata sterile e trasferirli in bottiglia sterile con tappo.
- Pesare 8 g di NaCl e 1,25 g di Agar Noble su bilancia tecnica e versarli nella bottiglia contenete i 100 ml di acqua distillata sterile.
- Immergere la bottiglia in bagnomaria in ebollizione oppure immetterla nel forno a microonde il tempo necessario per permettere lo scioglimento dell'agar.
- Agitare delicatamente la bottiglia di tanto in tanto ed osservare controlloce per verificare che l'agar si sia sciolto completamente. Quando la soluzione diverrà trasparente togliere la bottiglia dal bagnomaria o dal forno a microonde.
- Preparare il numero di piastre Petri necessario per aliquotare il terreno di Agar, indicando sul fondo la data di produzione, il lotto e registrare la preparazione del terreno sul "DSBIO MOD 062 - Registro soluzione e terreni". Su di una superficie perfettamente orizzontale, per ogni piastra distribuire 15 ml di terreno con una pipetta.
- Lasciare raffreddare e solidificare l'agar nelle piastre a temperatura ambiente senza coperchio
- Chiudere le piastre e porle in frigorifero capovolte (per evitare che la condensa si accumuli sulla superficie dell'agar) in un sacchetto per non oltre 15 giorni.

5. Verifiche preliminari

Condizioni ambientali

- Non sono richieste condizioni ambientali affinché la prova venga eseguita correttamente.

Condizioni strumentali

- Verificare che gli strumenti necessari per la prova siano correttamente funzionanti, che le attività di manutenzione siano state eseguite e che gli strumenti di misurazione siano in corretto stato di conferma metrologica.

Periodo di stabilizzazione richiesto per il campione

- Non sono richiesti periodi di stabilizzazioni o caratteristiche particolari per il campione affinché la prova venga eseguita correttamente.

6. Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Dopo il prelievo della presa di saggio, conservare il campione secondo:

- "IZS IDD 007 - Modalità di conservazione dei campioni";
- "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"

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 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
Letture piastre	Utilizzare guanti monouso

7.2 Manipolazione di campioni per esame sierologico

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 sierologico	Utilizzare guanti monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
Preparazione dell'agar su piastre Petri	Forno a microonde: utilizzo della visiera e dei guanti anticalore
Esecuzione dell'analisi	Utilizzare guanti monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
Letture piastre	Utilizzare guanti monouso
Per tutte le fasi di processo	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

8. Modalità operative

PREPARAZIONE CAMPIONE

- Le prove AGID vengono condotte su campioni di siero di sangue: nel caso i campioni non fossero sierati provvedere a rompere il coagulo e a centrifugare a 1000 g per 10 minuti.

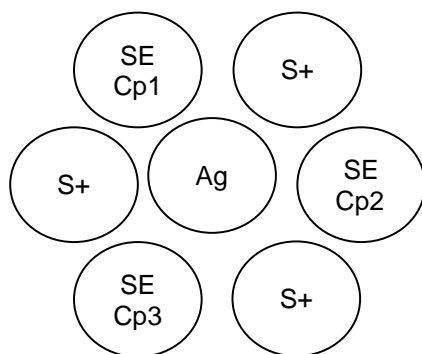
CONTROLLI

- Controllo siero di riferimento positivo:** preparato seguendo "DSBIO IOP 058 - Produzione di sieri policlonali in volatili domestici mediante l'uso di antigeni inattivati"
- Controllo antigene di riferimento:** preparato seguendo "DSBIO IOP 057 - Produzione ed inattivazione dell'antigene da utilizzare nella prova di Agar Gel Immunodiffusione (AGID) per la ricerca di anticorpi precipitanti indotti dai Virus Influenzali di tipo A

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. Compilare l'apposito foglio di lavoro "DSBIO MOD 004 - Scheda registrazione dati per prova di agar gel immunodiffusione".

- Praticare sullo strato di agar dei 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 i reagenti secondo lo schema riportato e nel dettaglio:
- Distribuire 25 µl di antigene (Ag) nel pozzetto centrale
- Distribuire 25 µl di antisiero positivo (S+) in tre pozzetti alternati rispetto ai campioni di siero in esame (SE)
- Distribuire 25 µl dei campioni di siero in esame in un pozzetto SE



- Incubare le piastre in camera umida a temperatura ambiente per 48 ore.
- Per una corretta lettura e registrazione dei dati, seguire il senso orario la numerazione degli stampi e dei campioni al suo interno indicati nell'apposito modulo "DSBIO MOD 004".

8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

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.

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
Qualora NON si osserva la banda di precipitazione tra antigene e siero in esame oppure è presente ma NON è in continuità con la banda di precipitazione fra l'antigene e l'antisiero positivo	NEGATIVO	NEGATIVO
Qualora si osserva 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	POSITIVO	POSITIVO

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

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
02	28.04.22	Revisione per adeguamento normativa di riferimento da Dec CE 2006/437 a Manuale OIE, posizionamento dei controlli, documenti di riferimento dei rifiuti e nuovo layout	Dr.ssa F. Gobbo L. Boscolo	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa D. Dellamaria	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
03	18.04.24	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
04	22.12.25	Revisione formale del testo e per aggiornamento dell'anno del metodo WOA; non ci sono variazioni nelle modalità operative	Dr.ssa P. Perini	Dr. A. Bortolami Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli