

# PDP IMM 065

## Ricerca degli anticorpi nei confronti del virus della malattia di Newcastle mediante inibizione dell'emoagglutinazione (DPR 657/96 GU n°300 del 23/12/1996 cap. 4, 5 e 6)

### 0. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
00	30.09.10	Revisione formale atta a rendere la procedura autoportante e nuova codifica della PDP (ex PDV VIR 06)	Dr. C. Terregino Valeria Brasola	RQ-Dr.A.Cereser	Direttore Sanitario Dr.S.Marangon
01	22.02.13	Adeguamento normativa, e revisione modifiche acronimo struttura nei documenti citati	Dr. C. Terregino	RQ-Dr.A.Cereser Dr. S. Nardelli	Direttore Sanitario Dr.S.Marangon

### 1. Scopo e campo di applicazione

Scopo di questa procedura è descrivere le modalità operative connesse alla ricerca degli anticorpi nei confronti del virus della Malattia di Newcastle mediante prova di inibizione dell'emoagglutinazione.

La procedura si applica ai sieri di specie pollo (*Gallus gallus*) e a sieri di specie diversa. Questi ultimi devono subire un idoneo pretrattamento per eliminare eventuali agglutinine aspecifiche.

La ricerca degli anticorpi anti -virus della Malattia di Newcastle viene eseguita mediante la prova di inibizione dell'emoagglutinazione. Tale prova è in grado di svelare sia anticorpi vaccinali che da infezione naturale.

La procedura di prova prevede una prima fase di titolazione dell'antigene mediante prova di emoagglutinazione, seguita poi dalla prova di inibizione dell'emoagglutinazione sui sieri diluiti.

Questa procedura è la trascrizione di quanto previsto dal DPR 657/96 GU n° 300 del 23/12/1996 cap. 4, 5 e 6 che istituisce misure comunitarie di lotta contro la malattia di Newcastle.

### 2. Documenti di riferimento

- Direttiva 92/66/CEE del Consiglio del 14/07/1992 che istituisce misure comunitarie di lotta contro la malattia di Newcastle.
- DPR 657/96 GU n° 300 del 23/12/1996 cap. 4, 5 e 6 "Regolamento per l'attuazione della direttiva 92/66/CEE che istituisce misure comunitarie di lotta contro la Malattia di Newcastle".
- OIE Terrestrial Manual 2009 – chapter 2.3.14.
- Fascicolo di validazione consultabile presso il laboratorio di virologia speciale della SCS6.

### 3. Definizioni e acronimi utilizzati

Emoagglutinazione: fenomeno caratteristico di alcuni microrganismi che permette al microrganismo stesso di legarsi in maniera più o meno reversibile ai globuli rossi di una determinata specie.

Inibizione dell'emoagglutinazione: test per l'individuazione di anticorpi specifici basato sulla inibizione del fenomeno di emoagglutinazione.

### 4. Descrizione delle attività e responsabilità

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

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

#### 4.1 Attrezzature/strumenti/accessori

- Vetreria
- Pipette e provette
- Frigorifero +4 °C ± 3 °C
- Congelatore - 20 °C (+ 2 -10) °C
- Piastre da microtitolazione a 96 pozzetti fondo a V
- Micropipette volume variabile
- Puntali per micropipette
- Microdiluitore /Pipetta multicanale
- Siringhe per microdiluitore
- bagnomaria a 56°C ± 2°C
- Dispositivi di protezione individuale (DPI) indicati al p.4.3

#### 4.2 Reagenti/soluzioni/kit diagnostici

- Soluzione di PBS fornita dal Centro servizi alla produzione SC1
- Albumina bovina – prodotto commerciale
- Sospensione di globuli rossi di pollo all' 1% e al 10% (vedi ALL PDP 039 che fa parte integrante della presente procedura)
- Siero positivo di riferimento anti-NDV oggetto di prova fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6
- Siero negativo oggetto di prova fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6
- Antigene emoagglutinante NDV oggetto di prova fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6

N.B. I sieri di riferimento vengono prodotti in laboratorio dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6, liofilizzati e conservati a -20°C. Dopo essere stati ricostituiti vengono conservati a -20°C.

### 4.3 Norme di sicurezza

#### 4.3.1 Manipolazione di campioni identificati con bollino o timbro di “RISCHIO SANITARIO”:

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

#### 4.3.2 Manipolazione di campioni per esame sierologico:

<b>FASI DI PROCESSO</b>	<b>MISURE DI PREVENZIONE DA APPLICARE</b>
Preparazione del campione per esame sierologico.	Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
Esecuzione dell'analisi	Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
Lettura piastre	Utilizzare guanti in lattice/nitrile monouso
Per tutte le fasi di processo	<b>Avvertenze:</b> frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

### 4.4. Modalità operative

#### 4.4.1 Titolazione dell'antigene: Emoagglutinazione (HA)

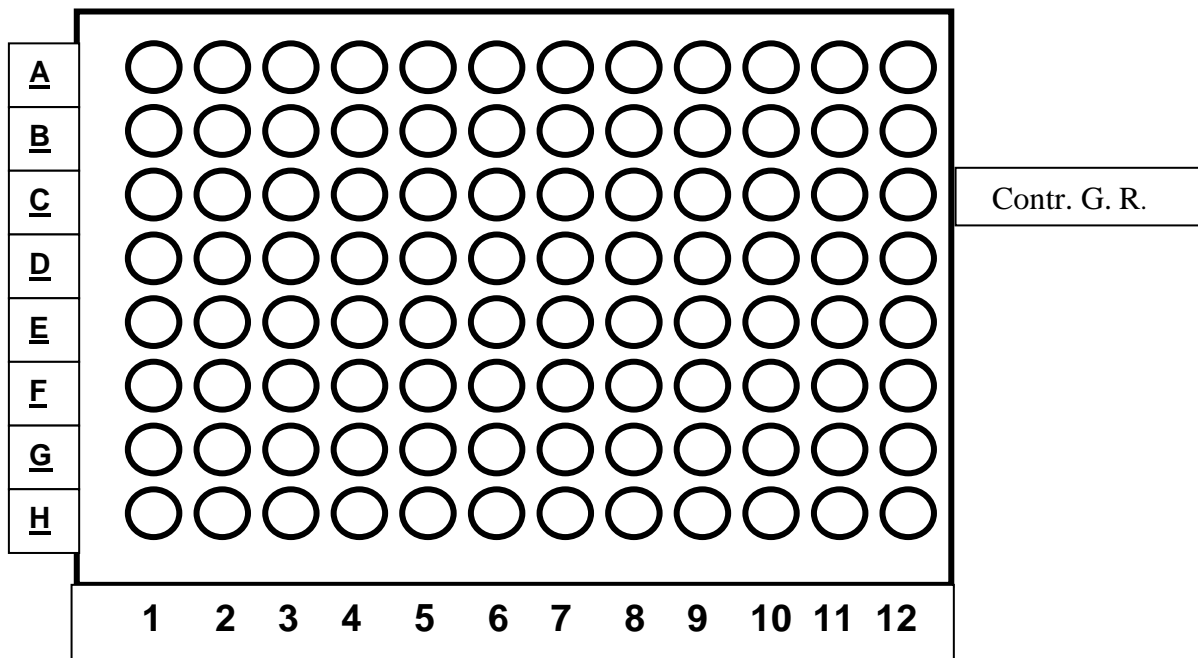
- Preparare una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti con fondo a V e porre, nelle prime tre file orizzontali (A B C) 25 µl di soluzione di PBS (come indicato nella fig. 1).
- Aggiungere, nel primo pozzetto di ognuna delle prime due file (A1 e B1), 25 µl di antigene emoagglutinante e diluirlo per raddoppio fino ai pozzetti A12 e B12
- Eliminare gli ultimi 25 µl
- Aggiungere 25 µl di PBS nelle file A B e C
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 µl di sospensione di globuli rossi di pollo all'1%
- Agitare delicatamente la piastra
- Mantenere la piastra a +4°C per 30' – 40'.

La lettura si effettua inclinando la piastra, ed osservando se i globuli rossi sedimentati scorrono sotto forma di goccia. Il flusso nei pozzetti che non presentano emoagglutinazione deve essere identico a quello che si osserva nei pozzetti che contengono esclusivamente i globuli rossi (fila del controllo globuli rossi).

Per la successiva prova di inibizione dell'emoagglutinazione è necessario avere una sospensione virale con titolo pari a 4 unità emoagglutinanti.

Il calcolo delle unità emoagglutinanti si effettua come segue: l'ultimo pozzetto dove è presente attività emoagglutinante è considerata una unità emoagglutinante, per averne 4 si dovrà utilizzare la diluizione che contiene quattro volte quella concentrazione virale. Ad esempio, se si ha una unità emoagglutinante alla diluizione di 1:512, le quattro unità si avranno diluendo il virus 1:128 (512:4 = 128).

Figura 1



Contr. G. R.= controllo Globuli Rossi all'1%

Riportare i risultati ottenuti nell'apposito foglio di lavoro (DSBIO MOD 005)

#### 4.4.2 Preparazione e diluizione dei sieri di specie pollo (Gallus gallus) e prova di inibizione dell'emoagglutinazione (HI)

- Conservare i sieri alla temperatura di +4°C o congelati fino al momento della prova
- Preparare un numero di piastre da microtitolazione a 96 pozzetti con fondo a V in base al numero di sieri da analizzare, tenendo conto che l'ultima fila di ogni piastra verrà utilizzata per il controllo delle 4 unità emoagglutinanti e per il controllo dei globuli rossi e che per ogni sessione analitica verranno inseriti il siero di controllo positivo e il siero di controllo negativo
- Numerare progressivamente le piastre e riportare in uno schema la distribuzione dei sieri nei pozzetti in modo tale che ogni siero sia sempre individuabile (DSBIO MOD 006)
- In ogni piastra, distribuire 25 µl di PBS in tutti i pozzetti tranne nella fila orizzontale H che sarà usata per il controllo della 4 unità emoagglutinanti e per il controllo globuli rossi.
- Porre, nella ultima fila orizzontale (H) della stessa piastra, 25 µl di PBS nei pozzetti da H2 ad H12 (come indicato in fig. 2).
- Aggiungere, nei primi pozzetti (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1) 25 µl di siero in esame e diluirli per raddoppio fino all'ultimo pozzetto.
- Eliminare gli ultimi 25 µl
- Diluire l'antigene in PBS in modo da avere una sospensione virale contenente 4 unità emoagglutinanti (UHA) in 25 µl e mantenerlo a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'utilizzo
- Aggiungere 25 µl di antigene diluito contenente 4 UHA in tutti i pozzetti tranne nella fila H
- Aggiungere nei pozzetti H1 e H2 25µl di antigene diluito e, a partire dal pozzetto H2, diluirlo per raddoppio fino al pozzetto H6. Porre nella fila orizzontale H, 25 µl di PBS addizionato di albumina bovina allo 0.05%. In questa fila si otterrà il controllo delle 4 unità emoagglutinanti e dei globuli rossi
- Agitare delicatamente la piastra e tenerla a + 4 °C per 60 minuti oppure a temperatura ambiente per 30 minuti
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 µl di sospensione di globuli rossi di pollo all'1%.

- Agitare delicatamente la piastra e tenerla a + 4 °C per 60 minuti oppure a temperatura ambiente per 30 minuti
- I campioni possono anche essere diluiti tenendo la piastra in posizione verticale (H1-H11) e diluendo per raddoppio fino alla colonna A. In questo modo si otterrà una diluizione massima del siero di 1:256, verranno utilizzati sei pozzetti dell'ultima riga (12) per il controllo delle 4 unità emoagglutinanti e due pozzetti della stessa riga per il controllo dei globuli rossi (come indicato in fig. 3)

**figura 2**

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
<b>A</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>B</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>C</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>D</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>E</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>F</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>G</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>H</b>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Contr. 4 UHA
 Contr. G. R.

Contr. 4 UHA= controllo 4 dosi emoagglutinanti  
 Contr. G.R.= controllo globuli rossi di pollo all'1%



emoagglutinanti e per il controllo dei globuli rossi e che per ogni lotto di piastre verranno inseriti il siero di controllo positivo e il siero di controllo negativo

- Numerare progressivamente le piastre e riportare in uno schema la distribuzione dei sieri nei pozzetti in modo tale che ogni siero sia sempre individuabile (DSBIO MOD 006)
- Lasciare 25 µl di PBS anche nei due panetti di S+ e S $\phi$
- Lasciare la colonna 2 vuota
- Distribuire nei rimanenti pozzetti della piastra 25 µl di PBS, tranne che nella fila orizzontale H, che verrà utilizzata per il controllo della 4 unità emoagglutinanti e per il controllo globuli rossi
- Porre, nell'ultima fila orizzontale (H), 25 µl di PBS nei pozzetti da H2 a H12
- Distribuire, nei primi pozzetti (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1) 25 µl di siero in esame
- Aggiungere, ai primi pozzetti (A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1) 25 µl di sospensione di globuli rossi di pollo al 10%. Viene in questo modo fatto il pretrattamento dei sieri nei pozzetti della diluizione 1:2.
- Lasciare a temperatura ambiente per 30'
- Distribuire 25 µl di surnatante dei pozzetti della colonna 1 nei pozzetti della colonna 2
- Distribuire 25 µl di surnatante dei pozzetti della colonna 1 nei pozzetti della colonna 3, e da questa diluire i sieri per raddoppio fino all'ultimo pozzetto
- Eliminare gli ultimi 25 µl
- Diluire l'antigene in PBS in modo da avere 4 unità emoagglutinanti (UHA) in 25 µl e mantenerlo a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'uso
- Aggiungere 25 µl antigene diluito contenente 4UHA in tutti i pozzetti tranne nella fila H
- Aggiungere nei pozzetti H1 e H2 25 µl di antigene e, a partire dal pozzetto H2, diluirlo per raddoppio fino al pozzetto H6.
- Aggiungere in tutta la fila H 25 µl di PBS addizionata di albumina allo 0.05%. In questa fila si otterrà il controllo delle 4 unità emoagglutinanti e dei globuli rossi
- Agitare delicatamente la piastra e tenerla a + 4 °C per 60 minuti oppure a temperatura ambiente per 30 minuti
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 µl di sospensione di globuli rossi di pollo all'1%.
- Agitare delicatamente la piastra e tenerla a + 4 °C per 60 minuti oppure a temperatura ambiente per 30 minuti
- I campioni possono anche essere diluiti tenendo la piastra in posizione verticale (H1-H11) e diluendo per raddoppio fino alla colonna A. In questo modo si otterrà una diluizione massima del siero di 1:256, verranno utilizzati sei pozzetti dell'ultima riga (12) per il controllo delle 4 unità emoagglutinanti e due pozzetti della stessa riga per il controllo dei globuli rossi. (Fig. 2)

#### 4.4.4 Lettura

- La lettura si effettua tenendo la piastra in posizione inclinata ed osservando fino a quale diluizione il siero inibisce l'emoagglutinazione, ovvero fino a quale diluizione del siero, tenendo la piastra in posizione verticale, vi è la formazione di gocce che "scorrono" alla stessa velocità dei globuli rossi di controllo.
- Il controllo delle 4 UHA deve dare i seguenti risultati:
- Emoagglutinazione nei primi 3 pozzetti (rispettivamente 4, 2 ed 1 unità), emoagglutinazione parziale nel quarto pozzetto (0.5 unità) e assenza di emoagglutinazione negli ultimi due pozzetti.
- I risultati sono validi se si ottiene un titolo inferiore a 1:8 con il siero negativo di controllo ed un titolo uguale, una diluizione superiore o una immediatamente inferiore al titolo noto del siero positivo di controllo.
- NB.: Nel caso dei sieri di specie diversa dal pollo, tenere presente che la prima diluizione del siero non viene presa in considerazione a causa dell'aggiunta della sospensione di globuli rossi di pollo al 10%.
- 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.



#### 4.5 Espressione dei risultati

Il titolo anticorpale riportato nel rapporto di prova è dato dalla massima diluizione del siero in grado di inibire la reazione di emoagglutinazione, ovvero si riporta la diluizione del siero più alta che determina la formazione della goccia di globuli rossi ad es. 1:128. I sieri che hanno un titolo maggiore o uguale a 1:4096, vengono definiti come " $\geq 1:4096$ ".

I sieri con titolo  $\leq$  a 1:8 vengono definiti negativo.

Il campione che fornisce risultati non interpretabili viene definito come "non idoneo".

#### 4.6 Caratteristiche del metodo

Essendo la prova una prova validata e normata a livello nazionale e dell' UE, è pertanto considerata metodica di riferimento o "gold standard". La sensibilità analitica viene valutata mediante il titolo del siero di riferimento positivo, in ogni seduta di lavoro.

#### 4.7 Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

I campioni vengono eliminati solo dopo l'emissione del RDP, secondo quanto riportato nell'allegato ALL 06 (IO IZSV 33) "Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di tipo sierologico", nella sua ultima revisione, e che costituisce parte integrante della presente procedura.

#### 4.8 Rapporto di prova

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

#### 5. Documenti allegati e/o correlati

- **Manuale della Qualità MQI:** Sezione 5.10 "Presentazione dei risultati del laboratorio di prova"
- **DSBIO MOD 005**" Scheda registrazione dati per prova di titolazione/emoagglutinazione"
- **DSBIO MOD 006 (PDP VIR 04-06):** " Scheda registrazione dati per prova di inibizione dell'emoagglutinazione"
- **ALL PDP 039:** preparazione e standardizzazione di una sospensione di globuli rossi allo 0.5%, all'1% e allo 10% per la diagnostica di laboratorio
- **ALL 06 (IO IZSV 33):** "Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di tipo sierologico",