1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Ricerca anticorpi nei confronti del virus della malattia di Newcastle	Siero di sangue di specie aviare*	Inibizione dell'emoagglutinazione

*I sieri di specie diversa da pollo (*Gallus gallus*) devono subire un idoneo pretrattamento per eliminare eventuali agglutinine aspecifiche.

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:
- WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap 3.3.10 par. B.2.1.2 2021

Bibliografia di riferiimento:
- WOAH Manual for Terrestrial Animals Cap 3.3.10 par. B.2.1.2 2021 - *Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus)*

Caratteristiche del metodo:
- Fascicolo di validazione n. IMM065V

3. Attrezzature, apparecchiature e consumabili

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

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 emoagglutinante NDV	Fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6	≤ -18°C (liofilizzati) o a ≤ -70°C (in forma liquida)
Siero negativo	Fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6	≤ -18°C
Siero positivo di riferimento anti-NDV	Fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6	≤ -18°C

NOTE:
- I sieri di riferimento dopo essere stati ricostituiti con 1 ml d'acqua distillata sterile e aliquotati vengono conservati a ≤-18°C compilando il modulo "**DSBIO MOD 018** - Registro carico scarico materiali di riferimento"
- Le vial di antigene prodotte dal laboratorio U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione della SCS6 vengono liofilizzate e conservate a ≤-18°C (**DSBIO MOD 018**). All'uso vengono risospese con 1 ml in acqua distillata sterile, se non utilizzate completamente, possono essere conservate per un massimo di sette giorni in frigorifero tra +2°C e +8°C ed utilizzate per produrre le 4 HAU previa controllo del titolo tramite HA. Per gli antigeni utilizzati occasionalmente è opportuno congelare la vial risospesa a ≤-70°C e riutilizzarla per la produzione delle 4 HAU previa controllo del titolo in HA.

4.1 Preparazione delle soluzioni

La soluzione di globuli rossi all'1% e 10% viene preparata seguendo "**IZS IDD 146 -** Preparazione di sospensioni di globuli rossi di specie aviare".

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'espirazione 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 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	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

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
Esecuzione dell'analisi	Utilizzare guanti monouso e gli appositi sistemi di aspirazione
Lettura piastre	Utilizzare guanti monouso
Per tutte le fasi di processo	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

8. Modalità operative

PREPARAZIONE CAMPIONE

La prova viene condotta 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

Diversi controlli di processo sono inclusi nelle varie fasi di questa procedura di prova.

- **Controllo globuli in HA e HI**: preparati seguendo istruzione "**IZS IDD 146"**.
- **Controllo delle 4 HAU:** diluendo in PBS l'antigene prodotto seguendo "**DSBIO IOP 056** - Produzione, titolazione ed inattivazione degli antigeni emoagglutinanti dell'Influenza Aviare e della Malattia di Newcaslte"
- **Controllo siero riferimento negativo e positivo**: preparati seguendo "**DSBIO IOP 058** - Produzione di sieri policlonali in volatili domestici mediante l'uso di antigeni inattivati"

ANALISI

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 temperatura ambiente per 30 minuti oppure per 1 ora a +4°C.

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 (HAU), per averne 4 si dovrà utilizzare la diluizione che contiene quattro volte quella concentrazione virale. Ad esempio, se si ha una HAU alla diluizione di 1:512, le quattro unità si avranno diluendo il virus 1:128 (512:4 = 128). Riportare i risultati ottenuti nell'apposito foglio di lavoro (**DSBIO MOD 005 -** Scheda registrazione dati per prova di titolazione/emoagglutinazione).

Figura 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	
B	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	
C	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**O**	**Contr. G. R.**
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	

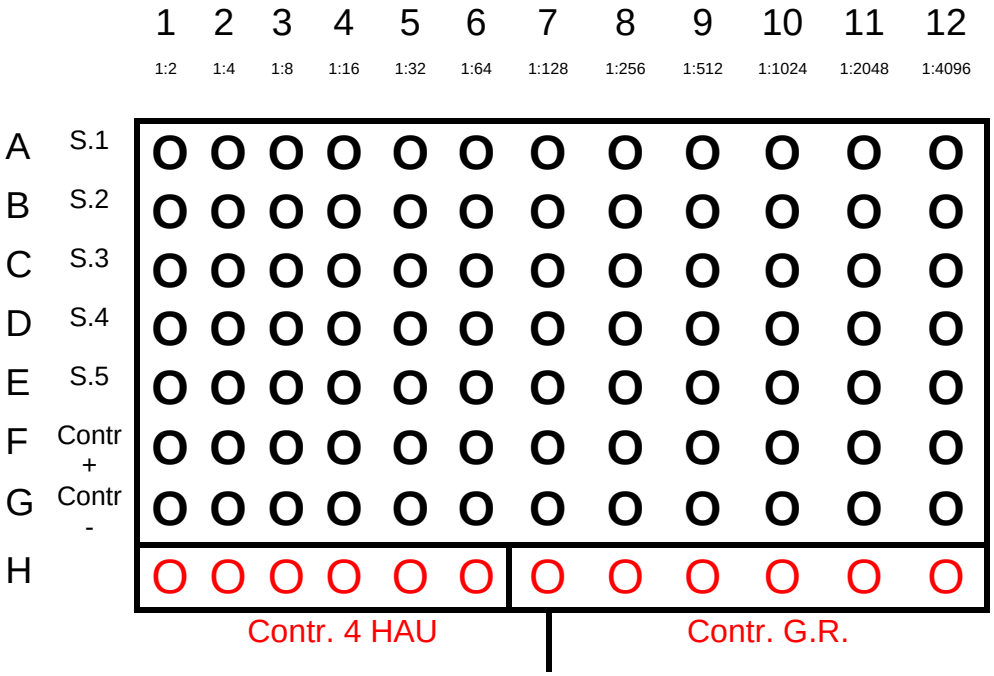
Contr. G. R.= controllo Globuli Rossi all'1%

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

- Conservare i sieri alla temperatura tra +2°C e +8°C 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 HAU 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 (compilando il modulo "**DSBIO MOD 018"**).
- 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** - Scheda registrazione dati per prova di inibizione dell'emoagglutinazione)
- 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 HAU e per il controllo globuli rossi.
- Porre, nella ultima fila (H) della stessa piastra, 25 µl di PBS nei pozzetti da H2 ad H12 (come indicato in fig. 2).
- Aggiungere, nei primi pozzetti di ogni fila (da A1 a E1) 25 µl di siero in esame e distribuire nel pozzetto riservato al controllo positivo 25 µl di siero positivo e 25 µl di siero negativo nel pozzetto riservato al controllo negativo
- Diluire per raddoppio tutti i sieri in esame e i sieri di controllo positivi e negativi ed eliminare gli ultimi 25 µl
- Diluire l'antigene in PBS in modo da avere una sospensione virale contenente 4 HAU e mantenerlo a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'utilizzo

- Aggiungere 25 µl di antigene diluito contenente 4 HAU in tutti i pozzetti (comprese le file contenenti i sieri di controllo) tranne nella fila H
- Aggiungere nei pozzetti H1 e H2 25µl di 4 HAU e, a partire dal pozzetto H2, diluirlo per raddoppio fino al pozzetto H6. Porre in tutta la fila H, 25 µl di PBS nella quale si otterrà il controllo delle 4 HAU e dei globuli rossi (vedi figura 2).
- Agitare delicatamente la piastra e mantenerla a temperatura ambiente per 30 minuti oppure per 1 ora a +4°C.
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 µl di sospensione di globuli rossi di pollo all'1%.
- Agitare delicatamente la piastra e mantenerla a temperatura ambiente per 30 minuti oppure per 1 ora a +4°C.
- I campioni possono anche essere distribuiti 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 e verranno utilizzati sei pozzetti dell'ultima riga (12) per il controllo delle 4 HAU e due pozzetti della stessa riga per il controllo dei globuli rossi (come indicato in fig. 3)

Figura 2



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

Figura 3

		H	G	F	E	D	C	B	A
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1	S.1	O	O	O	O	O	O	O	O
2	S.2	O	O	O	O	O	O	O	O
3	S.3	O	O	O	O	O	O	O	O
4	S.4	O	O	O	O	O	O	O	O
5	S.5	O	O	O	O	O	O	O	O
6	S.6	O	O	O	O	O	O	O	O
7	S.7	O	O	O	O	O	O	O	O
8	S.8	O	O	O	O	O	O	O	O
9	S.9	O	O	O	O	O	O	O	O
10	Contr+	O	O	O	O	O	O	O	O
11	Contr-	O	O	O	O	O	O	O	O
12		O	O	O	O	O	O	O	O
		Contr. 4 HAU						Contr. G.R	

Preparazione e diluizione dei sieri di specie diversa dal pollo (*Gallus gallus*) e prova di inibizione dell'emoagglutinazione (HI)

- Conservare i sieri alla temperatura tra +2°C e +8°C fino al momento della prova
- Su indicazione del Dirigente eseguire un pretrattamento aggiuntivo in siero di specie particolari (es: faraone, quaglie, struzzi e specie allevate a scopo venatorio) che hanno fattori di emoagglutinazione o inibitori dell'emoagglutinazione che possono interferire sull'analisi, attraverso l'inattivazione in bagnomaria a 56°C per 30 minuti.
- 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 HAU e per il controllo dei globuli rossi. Per ogni sessione analitica verranno inseriti il siero di controllo positivo e il siero di controllo negativo (compilando il modulo "**DSBIO MOD 018"**).
- Numerare progressivamente le piastre e riportare in uno schema la distribuzione dei sieri nei pozzetti in modo tale che ogni siero sia sempre individuabile (vedere modulo "**DSBIO MOD 006"**)
- Nei pozzetti della colonna 1 (da A1 a E1) per ogni siero in esame, porre 50 µl di soluzione PBS e lasciare la colonna 2 vuota
- Distribuire nei rimanenti pozzetti della piastra 25 µl di PBS, tranne nella fila orizzontale H, che verrà utilizzata per il controllo della 4 HAU e per il controllo dei globuli rossi
- Porre, nell'ultima fila orizzontale (H), 25 µl di PBS nei pozzetti da H2 a H12 (vedi fig. 2)
- Porre 25 µl di PBS in tutti i pozzetti riservati ai sieri di controllo positivo e negativo i quali verranno trattati come normali sieri di pollo
- Distribuire, nei primi pozzetti per ogni fila (da A1 a E1) 25 µl di siero in esame
- Distribuire nel pozzetto riservato al controllo positivo 25 µl di siero positivo, distribuire 25 µl di siero negativo ne pozzetto riservato al controllo negativo e diluirli per raddoppio eliminando gli ultimi 25 µl

- Aggiungere, ai primi pozzetti contenenti i sieri in esame (da A1 a E1) 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 minuti
- 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 di ogni fila, eliminando gli ultimi 25 µl
- Diluire l'antigene in PBS in modo da avere 4 HAU e mantenerlo a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'utilizzo
- Aggiungere 25 µl antigene diluito contenente 4HAU in tutti i pozzetti tranne nella fila H
- Aggiungere nei pozzetti H1 e H2 25µl di 4 HAU e, a partire dal pozzetto H2, diluirlo per raddoppio fino al pozzetto H6. Porre in tutta la fila H, 25 µl di PBS nella quale si otterrà il controllo delle 4 HAU e dei globuli rossi (vedi figura 2).
- Agitare delicatamente la piastra e mantenerla a temperatura ambiente per 30 minuti oppure per 1 ora a +4°C
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 µl di sospensione di globuli rossi di pollo all'1%.
- Agitare delicatamente la piastra e mantenerla a temperatura ambiente per 30 minuti oppure per 1 ora a +4°C
- I campioni possono anche essere distribuiti 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 e verranno utilizzati sei pozzetti dell'ultima riga (12) per il controllo delle 4 HAU e due pozzetti della stessa riga per il controllo dei globuli rossi (come indicato in fig. 3)

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 (annotare i dati nel modulo "**DSBIO MOD 006"**).
- Il controllo delle 4 HAU deve dare i seguenti risultati: emoagglutinazione completa 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 mentre per il siero positivo di controllo un titolo uguale o una diluizione immediatamente superiore o una inferiore al titolo noto

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%.

8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

La prova si considera valida quando i controlli di processo forniscono i seguenti risultati:

- **Controllo globuli in HA e HI**: nei pozzetti non si deve osservare attività emoagglutinante.
- **Controllo delle 4 HAU/controllo virus**: 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.
- **Controllo siero riferimento negativo**: si osserva o emoagglutinazione completa o l'inibizione dell'emoagglutinazione non superiore alla diluzione 1:8.
- **Controllo siero riferimento positivo:** si osserva l'inibizione dell'emoagglutinazione con la conferma del titolo noto o con una diluizione immediatamente superiore o una inferiore a quello atteso

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
Campione pervenuto non idoneo (es. campione in quantità insufficiente per eseguire l'analisi, campione fortemente emolitico o coagulato, campioni di siero lipemici, ecc.)	INADATTO	INADATTO*
Campione di siero animale che NON inibisce il fenomeno dell'emoagglutinazione a nessuna diluizione testata o fino alla diluizione 1:8 (da 1:2 a 1:8)	NEGATIVO	NEGATIVO**
Campione di siero animale che inibisce il fenomeno dell'emoagglutinazione alla più alta diluizione del siero testato (in funzione del layout della piastra da 1:16 a 1:256 vedi fig. 3 o 1:4096 vedi fig. 2)	POSITIVO	POSITIVO**

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

* Il Responsabile di Laboratorio può aggiungere nel campo "note esterne" di Izilab la motivazione della non idoneità del campione
** Il Responsabile di Laboratorio può aggiungere nel campo "valore" di Izilab il titolo del campione

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
03	02.11.22	Revisione formale della descrizione del metodo	Dr. S. Trincanato Dr.ssa P. Perini	Dr.ssa V. Brasola Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
04	19.04.24	Revisione formale della descrizione del metodo per cambio acronimo da OIE a WOAH	Dr.ssa L. Guerra Dr.ssa P. Perini	Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli
05	02.09.24	Revisione per aggiornamento della numerazione del capitolo WOAH; adeguamento al layout PDP; correzioni formali	Dr.ssa P. Perini	Dr. C. Terregino Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli