

## 1. Scopo e campo di applicazione della prova

| Target                                  | Matrice   | Tecnica di prova  |
|---|---|---|
| Virus della Malattia di Newcastle (NDV) | Liquido allantoideo, surnatante cellulare, organi, tamponi, feci di specie aviare | Isolamento in uova embrionate, test di inibizione dell'emoagglutinazione, indice di patogenicità intracerebrale |

## 2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- WOAH Manual for Terrestrial Animals, Cap 3.3.10 par. B.1.2, 1.3, 1.4 2021

Bibliografia di riferimento:

- WOAH Manual for Terrestrial Animals, Cap 3.3.10, par. B.1.2, 1.3, 1.4, 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   | Tra +2°C e +8°C           |
| Polli SPF di 1 giorno                            | SCS3 Laboratorio Veterinario Centralizzato protezione animali utilizzati a fini scientifici stabulario BSL3  | 32-34°C                   |
| Sabbia di quarzo                                 | Commerciale  | Temperatura ambiente      |
| Siero policlonale di riferimento anti-NDV        | SCS6 - U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione / istruzione <b>DSBIO IOP 058</b> - Produzione di sieri policlonali in volatili domestici mediante l'uso di antigeni inattivati | Tra +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

### Condizioni ambientali

- Non sono richieste condizioni ambientali affinché la prova venga eseguita correttamente
- Attività da svolgere in BSL3

### 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 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  | <b>Avvertenze:</b> frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante   |

## 8. Modalità operative

### PREPARAZIONE CAMPIONE

Per la tracciabilità compilare il foglio di lavoro "DSBIO MOD 007 - Scheda registrazione dati per prova di isolamento virale su uova".

#### Tamponi

- Lasciare agire il campione con la soluzione di PBS antibiotata (volume finale 1 ml) per almeno 1-2 ore a temperatura ambiente.
- 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.
- Centrifugare il campione a 1000 x g per 10 minuti a temperatura tra +2°C e +8°C.
- Se l'inoculazione delle uova embrionate non viene effettuata il giorno stesso il surnatante trasferito in un nuovo provetta sterile (inoculo per uova SPF), 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, utilizzare il surnatante per infettare le uova embrionale di pollo SPF (9-11 giorni di incubazione) come descritto successivamente nel riquadro "Analisi".

#### Organi

- In condizioni di sterilità prelevare una quantità di campione paragonabile ad un cubo di un circa 1 cm<sup>3</sup> 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 nel riquadro "Analisi".

#### Feci

- In condizioni di sterilità 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 per la matrice feci trasferire il surnatante ottenuto in una nuova provetta sterile operando la filtratura con filtro 0,45 µm (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 nel riquadro "Analisi" Isolamento virale.

#### Liquido allantoideo/surnatante di colture cellulari

Il Laboratorio in quanto centro di referenza 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 riquadro "Analisi").

### CONTROLLI

- **Controllo globuli in HA e HI:** preparati seguendo istruzione **IZS IDD 146**.
- **Controllo delle 4 HAU/controllo virus:** diluendo in PBS il virus isolato.
- **Siero di riferimento positivo e negativo:** preparati seguendo istruzione **DSBIO IOP 058**.

### ANALISI

#### Inoculazione, incubazione e speratura delle uova embrionate (primo passaggio)

- Preparare per ogni campione almeno 4 uova SPF al 9°-11° giorno di incubazione per l'inoculazione in cavità allantoidea (modulo **DSBIO MOD 007**).
- Su ogni uovo praticare un foro al di sopra della linea che delimita la camera d'aria e inoculare 0.1 ml-0.2 ml di materiale in esame in cavità allantoidea.
- Sigillare le uova ed incubarle in termostato a +37 °C per la durata di sei giorni (primo passaggio).
- Sperare le uova giornalmente (modulo **DSBIO MOD 007**).
- Le uova contenenti embrioni morti o morenti entro la sesta giornata dall'inoculazione (primo passaggio) devono essere aperte in condizioni di sterilità, previo stoccaggio delle uova a temperatura di refrigerazione tra +2°C e +8°C per almeno 4-8 ore.
- Raccogliere 2-5 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.

### Prova di emoagglutinazione rapida

- In condizioni di sterilità prelevare una piccola aliquota di liquido allantoideo e porlo sulla piastra.
- 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 emoagglutinante.

**Presenza di attività emoagglutinante:** i globuli rossi verranno agglutinati formando dei granellini visibili ad occhio nudo, il campione viene considerato sospetto positivo per paramyxovirus e si procede con la successiva fase di emoagglutinazione lenta per il calcolo del titolo emoagglutinante della sospensione virale per il successivo test di 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 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).

### Inoculazione, incubazione e speratura delle uova embrionate (secondo passaggio)

- 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.
- 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.
- Sperare le uova giornalmente (modulo **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 modulo **DSBIO MOD 007**.

**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 lenta e calcolo del titolo emoagglutinante della sospensione virale e delle 4 HAU (Unità emoagglutinanti)

- 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 HAU). Poiché per la successiva tipizzazione mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione sono necessarie 4 HAU 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 HAU), le 4 HAU si avranno alla diluizione virale di 1:128 (512:4=128). Registrare il risultato sul modulo "DSBIO MOD 005 - Scheda registrazione dati per prova di titolazione/emoagglutinazione" o modulo analogo di struttura.

**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 | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
| Campione  | B | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
| Controllo | C | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
| globuli   | D | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|           | E | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|           | F | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|           | G | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|           | H | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |

### 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 a discrezione del dirigente un pannello di sieri di riferimento influenzali e anti-NDV, 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.

### Inibizione dell'emoagglutinazione con siero di riferimento anti NDV

- Per ogni campione con attività emoagglutinante predisporre una piastra 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 HAU) 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 HAU) 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 - 40 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 | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
| Siero di riferimento anti APMV-1 | B | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
| Siero di riferimento negativo    | C | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
| Controllo virus (D1-D6)          |   |     |     |     |      |      |      |       |       |       |        |        |        |
| Controllo globuli (D7-D12)       | D | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|                                  | E | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|                                  | F | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|                                  | G | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |
|                                  | H | ○   | ○   | ○   | ○    | ○    | ○    | ○     | ○     | ○     | ○      | ○      | ○      |

### 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)

**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 sono soggetti a denuncia esclusivamente i focolai sostenuti da virus con indice di patogenicità intracerebrale  $\geq 0.7$ .

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 maggiore di 1:16 preferibilmente dal primo isolamento
- Per l'accesso allo stabilimento utilizzatore assegnato per la prova, attenersi alle disposizioni operative specifiche descritte nel processo **PR GSTAB**.
- Iniettare 0,05 ml del virus diluito per via intracerebrale in 10 pulcini (SPF) 24 - 40 ore post schiusa.
- Esaminare i volatili ogni 24 ore per 8 giorni post infezione e registrare i dati nel modulo “**DSBIO MOD 027** - Scheda registrazione dati ICPI” o analogo modulo di struttura (vedi Fig.3).
- Attribuire ad ognuno dei volatili per ogni osservazione il loro stato clinico per ogni giornata di osservazione:  
Normale = 0  
Malato = 1  
Morto = 2

**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 eutanassica, secondo quanto descritto in istruzione “**IZS IDD 132** - Soppressione degli animali da laboratorio utilizzati a fini scientifici nello stabulario”, e processo “**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 dell'indice.

**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  |

**Note:**

10 volatili osservati per 8 giorni = 80 osservazioni (\*).

Indice = punteggio totale per numero di osservazioni 112/80 = 1.4.

\* Secondo quanto indicato nel sotto paragrafo B 1.4.1 del WOAH Manual for Terrestrial Animals cap. 3.3.10, per malattia di *Newcastle* si intende un'infezione di volatili causata da un ceppo aviare del *Paramyxovirus-1* con indice di patogenicità intracerebrale in pulcini di un giorno (ICPI) superiore o uguale a 0.7.

## 8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

| Parametro                             | Risultati attesi   | Azione in caso NC   |
|---------------------------------------|--|---|
| 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 | Qualora i controlli non dovessero fornire i risultati attesi, deve essere contattato il <u>responsabile di laboratorio o un suo delegato</u> 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 necessario ripeterla. |
| Controllo globuli in HA e HI          | Nei pozzetti non si deve osservare attività emoagglutinante  |   |
| Siero di riferimento negativo         | Non si deve osservare inibizione della emoagglutinazione o comunque non oltre la diluizione 1:8  |   |
| Siero di riferimento positivo         | Si deve osservare inibizione della emoagglutinazione   |   |

## 8.2 Espressione dei risultati

### 8.2.1 Isolamento in uova, Emoagglutinazione rapida e inibizione Emoagglutinazione

| 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/sieri di riferimento per NDV è da considerarsi negativo per AMPV-1.<br>[Il dirigente può eventualmente decidere di 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.   | POSITIVO                                   | POSITIVO                   |

### 8.2.2 ICPI

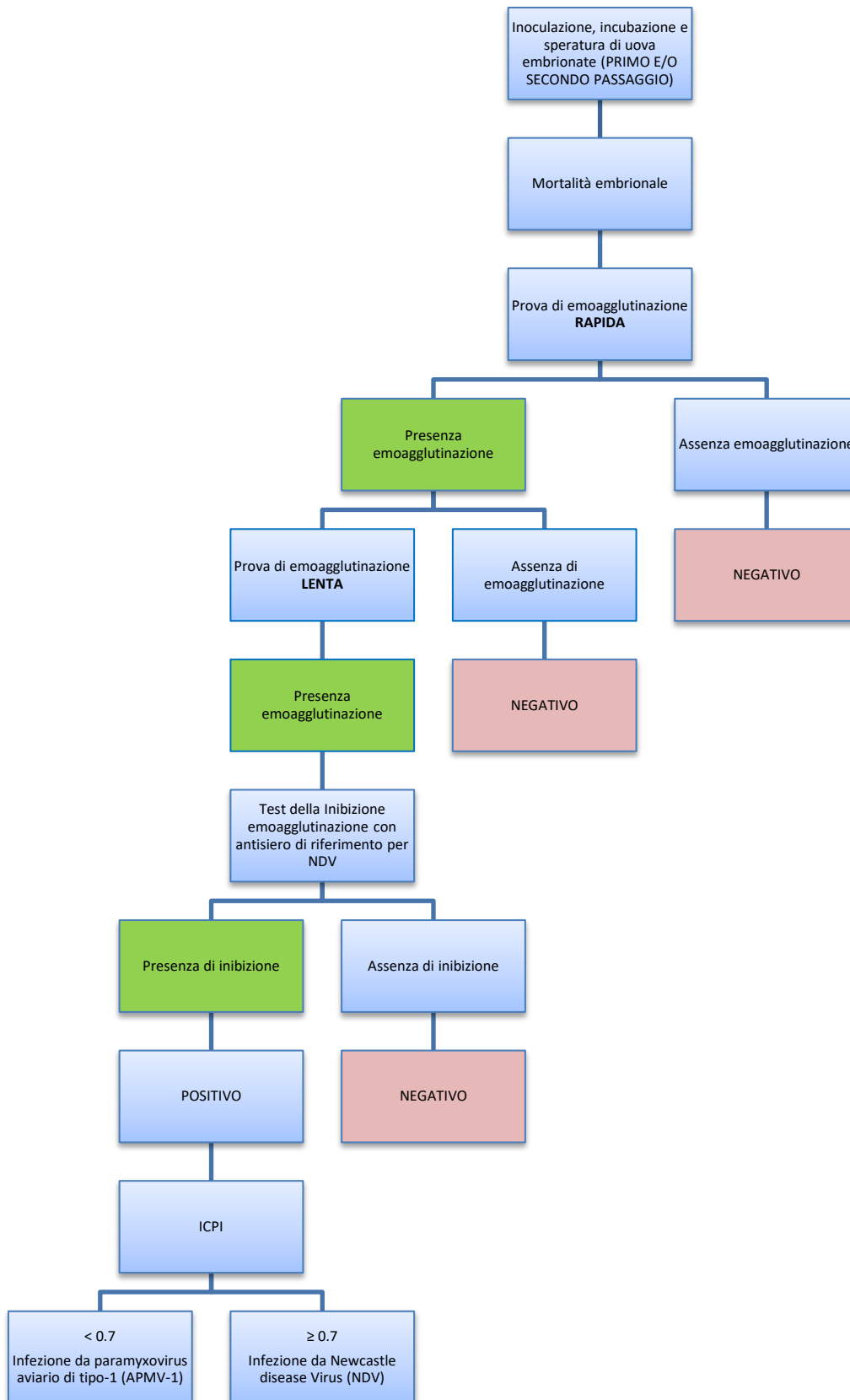
| CONDIZIONI DI LETTURA DEL CAMPIONE   | RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO  | RISULTATO ESPRESSO SUL RDP   |
|--|---|--|
| La patogenicità in vivo viene valutata mediante l'esecuzione del test dell'indice di patogenicità intracerebrale (ICPI) in pulcini SPF di 1 giorno | EFFETTUATO<br>L'INDICE DI PATOGENICITA'<br>INTRACEREBRALE RISULTA<br>ESSERE<br>(indicare il valore ottenuto dalla<br>tabella di calcolo fig. 3) | EFFETTUATO<br>L'INDICE DI<br>PATOGENICITA'<br>INTRACEREBRALE<br>RISULTA ESSERE<br>(indicare il valore ottenuto<br>dalla tabella di calcolo fig. 3) |

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

Vedi diagramma di flusso sotto riportato (Figura 4).

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.

**Figura 4:** Diagramma di flusso



## 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                             |
|------|----------|--|--------------------------------------|---|--|
| 10   | 24.03.23 | Revisione per eliminazione del riferimento al par B 1.1 del Manuale OIE, aggiornamenti formali e inserimento diagramma di flusso | Dr.ssa F. Gobbo<br>A. Costa          | Dr.ssa P. Carnieletto<br>Dr. C. Terregino | Direttore Sanitario<br>Dr.ssa G. Capelli |
| 11   | 17.04.24 | Revisione formale della descrizione del metodo per cambio acronimo da OIE a WOA  | Dr.ssa L. Guerra<br>Dr.ssa P. Perini | Dr.ssa P. Carnieletto                     | Direttore Sanitario<br>Dr. G. Cattoli    |
| 12   | 02.09.24 | Revisione per aggiornamento della numerazione del capitolo WOA; adeguamento al layout PDP; correzioni formali                    | Dr.ssa P. Perini                     | Dr.ssa P. Carnieletto<br>Dr. C. Terregino | Direttore Sanitario<br>Dr. G. Cattoli    |