Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
00	25.02.22	Prima emissione	Dr.ssa V. Panzarin Dr. C. Terregino	Dr.ssa E. Stefani Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Generale Dr.ssa A. Ricci
01	24.08.23	Revisione per aggiornamento norme di sicurezza, pooling di specie non galliformi, inserimento workstation Microlab NIMBUS, inserimento kit IndiMag Pathogen KF96 Cartridge, modifica di azioni in caso di non conformità del controllo interno	Dr.ssa E. Stefani Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa S. Leardini Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Generale Dr.ssa A. Ricci
02	06.12.24	Revisione per estensione campo di applicazione e inserimento kit MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit	Dr.ssa V. Panzarin Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa E. Stefani Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli

1. Scopo e campo di applicazione

Questo documento descrive la procedura per la preparazione del campione e per l'estrazione degli acidi nucleici con sistemi manuali ed automatici, per la successiva rilevazione del virus dell'influenza aviaria (AIV) e del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1) mediante metodi molecolari.
La procedura può essere applicata a isolati virali, organi/tessuti, feci e tamponi da specie aviarie e di mammifero, latte di origine animale e tamponi nasali/faringei umani adeguatamente raccolti e conservati.

2. Documenti di riferimento

- *Commission Decision 2006/437/EC approving a Diagnostic Manual for avian influenza as provided for in Council Directive 2005/94/EC*
- WOAH - *World Organization for Animal Health, Terrestrial Manual, Chapter 3.3.4. Avian influenza* (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (Version adopted in May 2021)
- WOAH - *World Organization for Animal Health, Terrestrial Manual, Chapter 3.3.10. Newcastle disease* (infection with Newcastle disease virus) (Version adopted in May 2021)

3. Definizioni e acronimi utilizzati

- **AIV**: virus dell'influenza aviaria
- **APMV-1**: Paramyxovirus aviario di tipo 1 (sin.: Orthoavulavirus aviario di tipo 1, AOAV-1)
- **Controllo interno (IC):** sequenza di RNA esogeno non target (IC-RNA, Indical) addizionato ad ogni campione, e sottoposto all'intero processo analitico a partire dalla fase di estrazione
- **Controllo negativo di processo (NPC)**: campione non contenente il target ricercato processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione, in presenza di IC-RNA (Indical)
- **Controllo positivo di processo (PPC):** campione contente il target ricercato processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione

Per le altre definizioni e abbreviazioni fare riferimento all'allegato "**ALL PDP 011** - Principi generali per l'esecuzione delle tecniche di prova di biologia molecolare basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)".

4. Descrizione delle attività e responsabilità

Il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato ha la responsabilità dell'organizzazione, del coordinamento e della verifica delle attività svolte dal personale incaricato (vedere elenco abilitati ai metodi di prova).

Il personale tecnico qualificato ha la responsabilità:

- della corretta esecuzione della procedura di prova qui descritta;
- della tracciabilità dei campioni in esame durante tutta la seduta analitica;
- della corretta gestione dei reagenti, kit e materiali di riferimento e delle apparecchiature.

Il processo analitico, la qualifica del personale, la corretta performance delle apparecchiature e la gestione dei reagenti/kit/materiali di riferimento utilizzati sono descritte nei documenti correlati riportati al paragrafo 5, che completano con un approccio trasversale la presente procedura.

4.1 Attrezzature/strumenti/accessori

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

- Centrifuga con rotore per provette da 15 e 50 ml con velocità di almeno 3000 × g
- KingFisher Flex Purification System with 96 PCR head (Thermofisher Scientific) e relativi consumabili (tip combs, piastre di eluizione da 96 pozzetti, piastre deep well da 96 pozzetti)
- Microlab Nimbus e relativi consumabili (tip combs, piastre di eluizione da 96 pozzetti, piastre deep well da 96 pozzetti, vaschette di plastica da 60 ml e 200 ml e puntali da 1000 µl e 300 µl con filtro).
- Microtubi per la conservazione di campioni ed acidi nucleici a ≤ -70°C
- QIAsymphony SP system (Qiagen) e relativi consumabili (microprovette da 2 ml compatibili, filter tips da 200 µl e 1500 µl, 8-rod covers, sample prep cartridges 8-well, elution microtubes CL and caps)
- TissueLyser II (Qiagen) e biglie in acciaio sterili da 5 mm

Per il corretto utilizzo e manutenzione delle apparecchiature fare riferimento ai relativi manuali d'uso e, ove previsti, ad altri documenti del sistema qualità (es. istruzioni operative (IO e IDD), procedure di taratura (PDT), allegati (ALL).

4.2 Reagenti/soluzioni/kit diagnostici

Dotazione base di un laboratorio di biologia molecolare (**ALL PDP 279 E**), con le seguenti integrazioni e/o specifiche riportate nella tabella sottostante:

Prodotto	Fornitore/Specifiche	Conservazione
100% Ethanol molecular grade	Commerciale	Temperatura ambiente
100% Isopropanol molecular grade	Commerciale	Temperatura ambiente
70% Ethanol molecular grade	Preparare la soluzione di etanolo al 70% miscelando 100% Ethanol molecular grade ed acqua per biologia molecolare nuclease-free nelle dovute proporzioni	Temperatura ambiente
Materiale di riferimento: antigene di influenza aviaria tipo A o di APMV-1	Controllo positivo di processo (PPC) (opzionale)/antigene prodotto e certificato dalla SCS6 U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione	≤ -70°C
Buffer ATL	Qiagen/Buffer per estrazione con QIAsymphony SP system/**DSBIO IOP 090** - Utilizzo dell'estrattore automatico QIAsymphony SP	Temperatura ambiente
Intype IC-RNA	Indical Bioscience/controllo interno/**ALL PDP 281** - Handbook intype IC-RNA	≤ -18°C
IndiMag Pathogen KF96 Cartridge	Indical Bioscience/estrazione con KingFisher Flex Purification System/**ALL PDP 331** - IndiMag Pathogen Cartridge Handbook	Temperatura ambiente
MagMax 96 AI/ND Viral RNA Isolation	Applied Biosystems/estrazione con KingFisher Flex Purification System/**ALL PDP 022** - MagMAX-96 AI/ND	Temperatura ambiente, ad esclusione di Beads

Kit	Viral RNA Isolation kit user guide	conservate tra + 2 °C e +8°C, Carrier e Enhancer a ≤ -18°C
MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit	Applied Biosystems/estrazione con KingFisher Flex Purification System/**ALL PDP 282** - MagMAX Pathogen RNA DNA kit	Temperatura ambiente, ad esclusione di Beads conservate tra + 2 °C e +8°C, Carrier e Enhancer a ≤ -18°C
MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit	Applied Biosystems/estrazione con KingFisher Flex Purification System/**ALL PDP 244** – MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit User Guide	Temperatura ambiente
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel/estrazione manuale/**ALL PDP 023 -** RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)	Temperatura ambiente ad esclusione della DNasi che si conserva tra + 2°C e + 8°C liofilizzata e a ≤ -18°C una volta ricostituita
PBS-A pH 7.4 ± 0.2	Centro Servizi alla Produzione dell'IZSVe/Soluzione phosphate-buffered saline antibiotato sterile	Tra +2 e +8°C
Polvere di quarzo	Commerciale/preparazione omogenati di organi/tessuti	Temperatura ambiente
PrimeStore MTM	Longhorn Vaccines & Diagnostics/diluizione latte di origine animale	Temperatura ambiente
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen/estrazione manuale/**ALL PDP 083** - QIAamp viral RNA mini Handbook	Temperatura ambiente ad esclusione del Carrier RNA che, una volta risospeso, viene aliquotato e conservato a ≤ -18°C
QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Kit (Qiagen)	Qiagen/estrazione con QIAsymphony SP system**/DSBIO IOP 090**	Temperatura ambiente ad esclusione del Carrier RNA che, una volta risospeso, viene aliquotato e conservato a ≤ -18°C

I prodotti commerciali citati sono quelli in uso presso IZSVe. Considerando che il presente documento è reso disponibile dal Centro di referenza a laboratori terzi, si precisa che questi prodotti sono riportati nel documento al solo scopo di facilitare i laboratori diagnostici che desiderano implementare il protocollo e non implicano alcuna promozione del prodotto. In nessun caso sarà precluso l'uso di reagenti o strumenti alternativi che si dimostrino idonei allo scopo.

4.3 Norme di sicurezza

Accesso ai laboratori e norme di comportamento	
È obbligatorio indossare durante tutte le fasi dell'attività: abbigliamento e calzature da laboratorio. Ogni ulteriore misura di biosicurezza sarà comunicata dal Responsabile di Laboratorio o un suo delegato, ove necessario.	
Fasi di processo	**Misure di prevenzione da applicare**
Prelievo del materiale conservato in congelatore ≤ -70°C	Maneggiare i campioni congelati con guanti antifreddo
Preparazione del campione per analisi biomolecolari e estrazione acidi nucleici	Eseguire tutte le operazioni sotto cappa biologica a flusso laminare di classe II. Utilizzare guanti monouso, manicotti o camice dedicato. L'utilizzo della mascherina FFP3 potrà essere richiesto da parte del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato a seguito di una analisi del rischio
Posizionamento dei campioni nelle piattaforme per estrazione automatizzata	Utilizzare guanti monouso, manicotti o camice dedicato
Per tutte le fasi di processo	Frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

4.4 Modalità operative

4.4.1 Verifiche da effettuare prima di iniziare la prova

Vedere istruzione "**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".

4.4.2 Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Conservare il campione secondo istruzione **IZS IDD 069.**
Nel dettaglio:

- Isolati virali, omogenato di organi/tessuti, feci, stemperato di tamponi vengono conservati in frigorifero tra + 2°C e + 8°C fino alla fine delle analisi relative e conseguente emissione di esito. I campioni di latte devono essere conservati a temperatura refrigerata se analizzati entro le 48 ore, contrariamente devono essere conservati a temperatura ≤ -70°C;
- Successivamente all'emissione dell'esito, i campioni positivi e di interesse biologico possono essere archiviati in congelatore a ≤ -70°C;
- Gli acidi nucleici estratti vengono conservati a ≤ -70°C fino all'utilizzo (oppure a temperatura + 2°C e + 8°C nel caso di utilizzo immediato).

4.4.3 Controlli

Al fine di assicurare l'attendibilità delle analisi biomolecolari in tutte le fasi del processo di diagnosi, i controlli di seguito riportati vengono inclusi in ogni seduta di estrazione:

- Controllo negativo di processo (NPC);
- Controllo interno (IC), ove previsto;
- Controllo positivo di processo (PPC), ove previsto, su indicazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato e solo per le metodiche biomolecolari che non prevedono l'uso del controllo interno.

4.4.4 Preparazione del campione

Vedere "**ALL PDP 009** - Istruzione per l'esecuzione di un test diagnostico mediante PCR: Buone pratiche di laboratorio", e **ALL PDP 011**.
In funzione della matrice in esame, utilizzare il kit di estrazione adeguato, come dettagliato di seguito:

Kit	Isolati	Stemperato di tamponi	Omogenato di organi/tessuti	Feci	Latte
NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel)		X	X	X	
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)	X	X			
QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Kit (Qiagen)	X	X	X	X	
MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystems)	X	X	X	X	X
IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (Indical Bioscience)		X	X		
MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems)					X
MagMax 96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit (*)	X	X			

(*) L'uso di questo kit è raccomandato in circostanze emergenziali motivate da specifiche necessità (es. mancato approvvigionamento dei rimanenti kit di estrazione)

I campioni possono essere analizzati in singolo o in pool. I pool devono essere costituiti da campioni provenienti dalla stessa unità epidemiologica, dalla stessa sede anatomica e dalla stessa specie. Eventuali scostamenti da queste indicazioni, devono essere definiti dal Responsabile di Laboratorio o un suo delegato. Al fine di evitare cross-contaminazioni, campioni da singole unità epidemiologiche devono essere processati con pinze e forbici sterili dedicate. Per l'intera procedura, utilizzare puntali con filtro e plastiche sterili.

4.4.4.1 Isolati

Prelevare mediante puntale sterile con filtro la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici.

4.4.4.2 Tamponi da specie aviarie e di mammifero

- In base alla tipologia e al numero di tamponi da processare, in provetta/tubo sterile dispensare un volume di PBS-A secondo le indicazioni sotto riportate.
  - tamponi singoli:
    punta sottile → 750 µl di PBS-A
    punta grossa → 1 ml di PBS-A
  - pool da 2-5 tamponi:
    punta sottile → 1 ml di PBS-A
    punta grossa → 2 ml di PBS-A
  - pool da 6-10 tamponi:
    punta sottile → 1,5 ml di PBS-A
    punta grossa → 3 ml di PBS-A
- Immergere la/e estremità del/i tampone/i nel PBS-A, recidere dall'asta manualmente, o con forbice/tronchesino e miscelare mediante vortex per circa 15 sec
- Immergere gli strumenti utilizzati in Virkon 1%, sodio ipoclorito 0.6% o altro idoneo disinfettante
- Alternativamente, la/e estremità del/i tampone/i possono essere immersi nel PBS-A per circa 30 sec assicurando il completo contatto con il liquido, e stemperati manualmente in modo vigoroso
- Centrifugare per 2 min a circa 18000 × *g*; questo step è opzionale per i tamponi tracheali, ma fortemente raccomandato per tamponi cloacali visibilmente sporchi di feci
- Prelevare mediante puntale sterile con filtro la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici

Importante: sebbene sia preferibile analizzare i tamponi singolarmente o in pool di dimensioni ridotte, in particolari condizioni (es. durante una emergenza epidemica) per galliformi è possibile analizzare pool da massimo 10 tamponi, al fine di rendere più efficiente il processo diagnostico e ridurre i tempi di refertazione. Per tamponi da specie non galliformi (es. anseriformi e ratiti) o ambiti circoscritti identificati dal Responsabile di Laboratorio in funzione della situazione epidemiologica, si raccomanda di unire in pool non più di 5 tamponi. Per tamponi da mammifero, analizzare i tamponi singolarmente.

4.4.4.3 Tamponi nasali/faringei umani

I tamponi devono essere conferiti in liquido di trasporto per applicazioni microbiologiche. Qualora i tamponi fossero conferiti senza terreno di trasporto, la conformità del campione stesso e le modalità di preparazione verranno stabilite dal Responsabile di Laboratorio su base puntuale. Prelevare mediante puntale sterile con filtro la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici. Analizzare i tamponi singolarmente.

4.4.4.4 Organi e tessuti da specie aviarie e di mammifero

Omogeneizzazione con pestello e mortaio

- Utilizzando forbici e pinze sterili prelevare circa 150-200 mg di tessuto (*) (corrispondenti a circa 5 mm^3) e deporli in un mortaio sterile
- Aggiungere una piccola quantità di polvere di quarzo e omogeneizzare con il pestello
- Aggiungere PBS-A sterile in rapporto 1:4 p/v (circa 450-600 µl), omogeneizzare e trasferire il materiale in una provetta sterile
- Immergere gli strumenti utilizzati in Virkon 1%, sodio ipoclorito 0.6% o analogo disinfettante
- Chiarificare il campione per 2 min a 18000 × *g*
- In una provetta sterile trasferire, mediante puntale sterile con filtro, la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici

Omogeneizzazione con TissueLyser II/TissueLyser III

- Utilizzando forbici e pinze sterili prelevare circa 150-200 mg di tessuto (*) (corrispondenti a circa 5 mm^3) e deporli in una provetta sterile
- Aggiungere una biglia in acciaio sterile da 5 mm di diametro
- Aggiungere PBS-A sterile in rapporto 1:4 p/v (circa 450-600 µl)
- Omogeneizzare secondo le specifiche di seguito riportate:
    - TissueLyser II: 1 ciclo a 30 Hz per 3 min
    - TissueLyser III: selezionare il programma "Program Cycles 1" che prevede 2 cicli a 30 Hz per 45 sec. Tra un ciclo e l'altro ruotare le piastre di 180° nel piano verticale e reinserirle nei supporti
- Immergere gli strumenti utilizzati in Virkon 1%, sodio ipoclorito 0,6% o analogo disinfettante
- Chiarificare il campione per 2 min a 18000 × *g*
- In una provetta sterile trasferire, mediante puntale sterile con filtro, la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici

(*) se il campione è composto da un pool di organi o organi molto voluminosi, prelevare porzioni di tessuto in più punti, ed aggiungere PBS-A sterile mantenendo inalterato il rapporto di diluizione (1:4 p/v). Per l'omogeneizzazione con TissueLyser II/TissueLyser III, prelevare non più di 3 porzioni di tessuto da circa 150-200 mg ciascuna (corrispondenti a circa 5 mm^3). Qualora ci fosse la necessità di prelevare più di tre porzioni di tessuto, procedere con pestello e mortaio.

Nel caso in cui la matrice da analizzare sia rappresentata da tamponi di encefalo raccolti in specifiche circostanze identificate dal Responsabile di Laboratorio (es. sorveglianza in volatili selvatici), procedere in conformità con quanto riportato al paragrafo 4.4.4.2 in base alla tipologia di tampone utilizzato per il prelievo.

4.4.4.5 Feci da specie aviarie e di mammifero

- Utilizzando uno strumento sterile, prelevare le feci (solitamente, 1 gr) e deporle in una provetta sterile
- Aggiungere PBS-A sterile in rapporto 1:4 p/v e risospendere accuratamente mediante vortex per 30 sec
- Immergere gli strumenti utilizzati in Virkon 1%, sodio ipoclorito 0,6% o analogo disinfettante
- Chiarificare il campione per 2 min a 18000 × *g*
- In una provetta sterile trasferire, mediante puntale sterile con filtro, la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici

4.4.4.6 Latte di origine animale

- In una provetta sterile trasferire, mediante puntale sterile con filtro, latte e PrimeStore MTM in rapporto 1:3 v/v (es. 500 µl in 1,5 ml di medium) e miscelare accuratamente. Prelevare la quantità di campione richiesta, in base al sistema di estrazione impiegato, e procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici. Nel caso di sospetto, per ciascun animale è necessario raccogliere il latte dai quattro/quarti ed unirlo in pool. Per aumentare la capacità di processazione, su indicazione del Responsabile di Laboratorio, è possibile unire in pool il latte di massimo 5 individui. Ai fini del monitoraggio nelle aziende di vacche da latte è possibile l'analisi del latte di massa, diluendo il campione secondo le stesse modalità sopra descritte.

4.4.5 Estrazione degli acidi nucleici

4.4.5.1 NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 023**. Applicare il protocollo "RNA purification from cultured cells and tissue" con le specifiche di seguito riportate. I volumi indicati si intendono per singolo campione. Nota: la seguente procedura non utilizza β-mercaptoetanolo.

- Miscelare 300 µl di Buffer RA1 e 300 µl di etanolo 70% in una microprovetta tipo Eppendorf sterile
- **Se previsto il controllo interno**: aggiungere 6 µl di intype IC-RNA, corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281**
- Aggiungere 100 µl di campione e miscelare mediante pipetta
- Posizionare una colonnina (NucleoSpin RNA Column, blue ring) all'interno di un tubo di raccolta (collection tube), trasferire il lisato nella colonnina e centrifugare per 30 sec a 11000 × *g*
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in un nuovo collection tube
- Aggiungere 350 µl di Membrane Desalting Buffer e centrifugare per 1 min a 11000 × *g*;
- Preparare la DNase reaction mixture in una microprovetta tipo Eppendorf sterile miscelando 10 µl di rDNase ricostituita e 90 µl di Reaction Buffer for rDNase
- Trasferire 95 µl di DNase reaction mixture direttamente al centro della membrana di silice della colonnina e incubare a temperature ambiente per 15 min;
- Aggiungere 200 µl di Buffer RAW2 e centrifugare per 30 sec a 11000 × *g*
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in un nuovo collection tube
- Aggiungere 600 µl di Buffer RA3 e centrifugare per 30 sec a 11000 × *g*
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in un nuovo collection tube
- Aggiungere 250 µl di Buffer RA3 e centrifugare per 2 min a 15000 × *g*
- Posizionare la colonnina in una microprovetta tipo Eppendorf da 1.5 ml sterile, ed eluire l'RNA in 60 µl di RNase-free H_2O centrifugando per 1 min a 11000 × *g*

4.4.5.2 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 083**

- Preparare la miscela di buffer AVL e carrier RNA-buffer AVE secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 083** e trasferire 560 µl della miscela in una microprovetta tipo Eppendorf da 1.5 ml sterile
- **Se previsto il controllo interno**: sottrarre alla miscela buffer AVL-carrier RNA un volume pari a 6 µl, ed aggiungere un egual volume di intype IC-RNA corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281**
- Aggiungere 140 µl di campione e miscelare accuratamente mediante vortex
- Incubare a temperatura ambiente per 10 min e centrifugare brevemente per rimuovere eventuali gocce dal tappo
- Aggiungere 560 µl di etanolo assoluto (96-100%), miscelare accuratamente mediante vortex, e centrifugare brevemente per rimuovere eventuali gocce dal tappo
- Trasferire 630 µl di lisato in una QIAamp Mini column e centrifugare per 1 min a 6000 × *g*
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in un nuovo collection tube
- Trasferire il rimanente lisato (630 µl) nella colonnina e centrifugare per 1 min a 6000 × *g*
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in un nuovo collection tube
- Aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare per 1 min a 6000 × *g*
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in un nuovo collection tube
- Aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare per 3 min alla massima velocità
- Eliminare il flow-through e posizionare la colonnina in una microprovetta tipo Eppendorf da 1.5 ml sterile
- Aggiungere 60 µl di Buffer AVE e incubare a temperatura ambiente per 1 min
- Eluire l'RNA centrifugando per 1 min a 6000 × *g*

4.4.6 Estrazione acidi nucleici automatica

4.4.6.1 QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit (Qiagen) con QIAsymphony SP instrument (Qiagen)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'istruzione **DSBIO IOP 090**

- **Se previsto il controllo interno**: preparare la miscela di Buffer AVE, carrier RNA e IC-RNA come indicato nella **DSBIO IOP 090**
- Distribuire 250 µl di Lysis Buffer ATL in microprovette da 2 ml sterili compatibili con lo strumento
- Aggiungere 300 µl di campione
- Procedere con l'estrazione degli acidi nucleici seguendo la procedura riportata nell'istruzione **DSBIO IOP 090**, applicando gli script C400OBL CR22710 ID3359 (**se previsto il controllo interno**) o "Complex 400_OBL_V4_DSP (se non previsto controllo interno)

4.4.6.2 MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystems) con KingFisher Flex Purification System with 96 PCR head (Thermofisher Scientific)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 282**. Applicare il protocollo "Low-cell-content samples" per "KingFisher Flex/MagMAX Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor" con le specifiche di seguito riportate. I volumi indicati si intendono per singolo campione.

- In un tubo sterile, preparare la Lysis/Binding Solution pipettando nell'ordine indicato: 250 µl di Lysis/Binding Solution Concentrate, 2 µl di Carrier RNA, 9 µl di intype IC-RNA (**se previsto il controllo interno**, corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281**) e 250 µl di isopropanolo 100%;
- Mescolare mediante vortex il reagente Nucleic Acid Binding Beads (biglie) e preparare la Bead Mix miscelando 10 µl di biglie e 10 µl di Lysis Enhancer;
- Allestire: tip comb plate (standard plate), due piastre contenenti 300 µl di Wash Solution 1 (deep well plate), due piastre contenenti 450 µl di Wash Solution 2 (deep well plate), una piastra contenente 90 µl di Elution Buffer (standard plate);
- In una deep well plate (sample plate) trasferire 20 µl di Bead Mix, 200 µl di campione e 500 µl di Lysis/Binding Solution;
- Selezionare il protocollo MagMAX_Pathogen (4462359_DW_HV o MagMAX_Pathogen_High volume 96 DW);
- Posizionare le piastre negli specifici alloggiamenti resi disponibili dallo strumento seguendo le istruzioni riportate sul display ed avviare lo strumento.

4.4.6.3 MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystems) con workstation Microlab NIMBUS integrata con King Fisher Presto System (Hamilton)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 282**.
Seguire quanto riportato nell'istruzione "**IZS IDD 286** - Utilizzazione della workstation robotizzata Microlab Nimbus integrata con King Fisher Presto (Hamilton)".
Aprire il protocollo *MagMax_Pathogen_DNA_RNA_HighVolume* nella versione in uso salvato nel computer associato al Microlab Nimbus e seguire le operazioni di preparazione del piano di lavoro e caricamento campioni indicate con le seguenti specifiche:

- In un tubo sterile, preparare la Lysis/Binding Solution pipettando nell'ordine indicato per ciascun campione: 250 µl di Lysis/Binding Solution Concentrate, 2 µl di Carrier RNA, 9 µl di intype IC-RNA (**se previsto il controllo interno**, corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281**) e 250 µl di isopropanolo 100%. Il volume totale di Lysis/Binding Solution da preparare viene calcolato automaticamente dal protocollo in base al numero complessivo di campioni da sottoporre ad analisi. Versare la soluzione in una vaschetta da 60 ml e collocarla all'interno dello strumento nella posizione indicata;
- Mescolare mediante vortex il reagente Nucleic Acid Binding Beads (biglie) e preparare in eppendorf da 2 ml la Bead Mix miscelando 10 µl di biglie e 10 µl di Lysis Enhancer per campione. Il volume totale di Beads Mix e il numero di provette da 2 ml da preparare viene calcolato automaticamente dal protocollo in base al numero di campioni complessivo da sottoporre ad analisi. Collocare le provette all'interno dello strumento nella posizione indicata;

- Riempire una vaschetta da 60 ml con il volume di Elution buffer calcolato automaticamente dal protocollo in base al numero di campioni da estrarre e posizionarla all'interno dello strumento nello spazio indicato;
- Riempire una vaschetta da 200 ml con il volume di Wash buffer 1 calcolato automaticamente dal protocollo in base al numero complessivo di campioni da estrarre, e collocarla all'interno dello strumento nella posizione indicata;
- Riempire una vaschetta da 200 ml con il volume di Wash buffer 2 calcolato automaticamente dal protocollo in base al numero complessivo di campioni da estrarre, e collocarla all'interno dello strumento nella posizione indicata.

4.4.6.4 IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (Indical Bioscence) con KingFisher Flex Purification System with 96 PCR head (Thermofisher Scientific)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 331**. Applicare il protocollo "Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples. Procedure for use with KingFisher Flex (or similar)" con le specifiche di seguito riportate. I volumi indicati si intendono per singolo campione.

- Miscelare per inversione la cartuccia "2" (Wash 1) fino a completa risospensione delle biglie;
- Centrifugare tutte le cartucce per 1 min a 500 × *g;*
- Rimuovere la pellicola protettiva dalla cartuccia "1" ("Lysate") e trasferire 200 µl di campione;
- In un tubo sterile, preparare una miscela composta da 500 µl di Lysis Buffer e 10 µl di intype IC-RNA (**se previsto il controllo interno**, corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281**);
- Trasferire nella cartuccia "1" ("Lysate") 500 µl della soluzione di lisi precedentemente preparata
- Rimuovere la pellicola protettiva dalle rimanenti cartucce;
- Selezionare il protocollo IndiMag_C_Pathogen_KF_Flex;
- Posizionare le piastre negli specifici alloggiamenti resi disponibili dallo strumento seguendo le istruzioni riportate sul display, posizionare il rod cover plate "6" ed avviare lo strumento.

4.4.6.5 MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems) con KingFisher Flex Purification System with 96 PCR head (Thermofisher Scientific)

Conservare i reagenti secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 244** Applicare il protocollo "Simple" per "KingFisher Flex/MagMAX Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor" con le specifiche di seguito riportate. I volumi indicati si intendono per singolo campione.

- Allestire: tip comb plate (standard plate), una piastra contenente 500 µl di MagMAX CORE Wash Solution 1 (deep well plate), una piastra contenente 500 µl di MagMAX CORE Wash Solution 2 (deep well plate), una piastra contenente 90 µl di MagMAX CORE Elution Buffer (standard plate);
- Mescolare mediante vortex il reagente MagMAX CORE Magnetic Beads (biglie);
- In un tubo sterile, preparare la bead/PK Mix pipettando nell'ordine indicato: 20 µl di MagMAX CORE Magnetic Beads, 10 µl di MagMAX CORE Proteinase K;
- In un altro tubo sterile, preparare la Lysis/Bindig Solution pipettando nell'ordine indicato: 350 µl di MagMAX CORE Lysis Solution, 350 µl di MagMAX CORE Binding Solution, 9 µl di intype IC-RNA (corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281**) e mescolare per inversione almeno 10 volte;
- Mescolare per inversione la bead/PK Mix;
- In una deep well plate (sample plate) trasferire 30 µl di bead/PK Mix e 200 µl di campione, e mescolare vigorosamente pipettando o mediante oscillatore orbitale per 2 min;
- Aggiungere 700 µl di Lysis/Binding Solution a ciascun campione;
- Selezionare il protocollo MagMAX_CORE_Flex (MagMAX_Core_Flex_No_Heat 96DW);
- Posizionare le piastre negli specifici alloggiamenti resi disponibili dallo strumento seguendo le istruzioni riportate sul display ed avviare lo strumento.

4.4.6.6 MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems) con workstation Microlab NIMBUS integrata con King Fisher Presto System (Hamilton)

Conservare i reagenti secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 244**. Applicare il protocollo "Simple" per "KingFisher Flex/MagMAX Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor".
Seguire quanto riportato nell'istruzione **IZS IDD 286**.
Aprire il protocollo *MagMax_CORE_NucleicPuification* nella versione in uso salvato nel computer associato al Microlab Nimbus e seguire le operazioni di preparazione del piano di lavoro e caricamento campioni indicate con le seguenti specifiche:

- In un tubo sterile, preparare la Lysis/binding solution come indicato nell'allegato **ALL PDP 244**. Il volume finale di Lysis/Binding solution da preparare viene indicato dal protocollo MagMax_CORE_NucleidPuification_v1.0 in base al numero di campioni da estrarre;
- Versare la soluzione in una vaschetta da 60 ml e posizionarla all'interno dello strumento come indicato dal protocollo;
- In un tubo tipo eppendorf da 2 ml preparare il reagente Bead/PK mix secondo l'allegato **ALL PDP 244**. Il volume finale di Beads Mix e il numero di provette da 2 ml da preparare viene indicato dal protocollo MagMax_CORE_NucleicPuification in base al numero di campioni da estrarre. Posizionare le provette all'interno dello strumento come indicato dal protocollo;
- Riempire e posizionare una vaschetta da 60 ml con il volume di Elution buffer calcolato dal protocollo in base al numero di campioni da estrarre;
- Riempire e posizionare una vaschetta da 200 ml con il volume di Wash buffer 1 calcolato dal protocollo in base al numero di campioni da estrarre;
- Riempire e posizionare una vaschetta da 200 ml con il volume di Wash buffer 2 necessario indicato dallo strumento.

4.4.6.7 MagMAX-96 AI/ND Viral RNA Isolation kit (Applied Biosystems) con KingFisher Flex Purification System with 96 PCR head (Thermofisher Scientific)

Kit raccomandato in circostanze emergenziali motivate da specifiche necessità (es. mancato approvvigionamento dei rimanenti kit di estrazione). Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 022**. Applicare il protocollo indicato nell'allegato **ALL PDP 022,** con le specifiche di seguito riportate. I volumi indicati si intendono per singolo campione.

- In un tubo sterile, miscelare miscelare 101 µl di Viral Lysis/Binding solution, 20 µl di Beads Resuspension solution e 5 µl di intype IC-RNA (corrispondenti a 1:10 del volume di eluizione, come indicato nell'allegato **ALL PDP 281)** e trasferire 123 µl della soluzione preparata in una deep well plate. Aggiungere 50 µl di campione;
- Allestire: tip comb plate (standard plate), due piastre deep well contenenti 100 µl di Wash Solution 1 e due piastre contenenti 100 µl di Wash Solution 2, una piastra contenente 50 µl di Elution Buffer (standard plate);
- Selezionare il protocollo MagMAX_AM1835_2xW1;
- Posizionare le piastre negli specifici alloggiamenti resi disponibili dallo strumento seguendo le istruzioni riportate sul display ed avviare lo strumento.

4.4.7 Analisi degli acidi nucleici estratti mediante metodi molecolari

Applicare le PDP in uso presso il laboratorio, in base al target virale ricercato.

4.4.8 Verifica delle condizioni di accettabilità

I risultati sono considerati attendibili se i controlli danno i risultati attesi. Per i criteri di accettabilità, fare riferimento alle specifiche PDP.
L'uso del controllo interno è raccomandato per minimizzare il rischio di risultati falsi negativi, dovuti ad una estrazione degli acidi nucleici sub-ottimale o alla presenza di inibitori della PCR nell'acido nucleico estratto. Se il controllo interno presenta risultati non conformi (negativo o con Ct > 30) associati ad un campione dubbio o negativo, l'amplificazione può essere ripetuta diluendo gli acidi nucleici estratti di un fattore 1:10. In alternativa, è possibile eseguire nuovamente l'analisi a partire da una nuova estrazione di acidi nucleici, diluendo maggiormente il campione biologico (tipicamente, arrivando ad una diluizione finale 1:10). Il controllo interno può presentare Ct > 30 o risultare negativo anche in campioni fortemente positivi per il

target virale, se co-amplificato in una reazione di tipo duplex. In tal caso, il campione può considerarsi conforme e l'analisi non necessita ripetizioni.

5. Documenti allegati e/o correlati

- **IZS IDD 007**: Criteri generali di idoneità dei campioni e modalità di conservazione
- **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
- **IZS IDD 286:** Utilizzazione della workstation robotizzata Microlab Nimbus integrata con King Fisher Presto (Hamilton)
- **ALL PDP 009**: Istruzione per l'esecuzione di un test diagnostico mediante PCR: Buone pratiche di laboratorio
- **ALL PDP 011:** Principi generali per l'esecuzione delle tecniche di prova di biologia molecolare basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)
- **ALL PDP 022:** MagMAX-96 AI/ND Viral RNA Isolation kit user guide
- **ALL PDP 023:** RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)
- **ALL PDP 083:** QIAamp viral RNA mini Handbook
- **ALL PDP 244:** MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit User Guide
- **ALL PDP 279 E:** Apparecchiature, reagenti, attrezzature e materiali consumabili per biologia molecolare
- **ALL PDP 281:** Handbook intype IC-RNA
- **ALL PDP 282:** MagMAX Pathogen RNA DNA kit
- **ALL PDP 331**: IndiMag Pathogen Cartridge Handbook
- **DSBIO IOP 090:** Utilizzo dell'estrattore automatico QIAsymphony SP