

# **PDP VIR 018**

## **Rilevazione del virus dell'Influenza Aviaria (Tipo A) mediante reverse transcriptase Real Time PCR**

### **0. Matrice delle revisioni**

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
04	29.02.2016	Revisione per inserimento preparazione del campione con campionatore robotizzato (sistema liquid handling)	Dr.ssa A. Drago Dr.ssa E. Stefani	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa I. Monne	Direttore Sanitario Dott. S Marangon
05	28.02.19	Revisione per inserimento metodo di estrazione automatizzato	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa S. Marciano	Dr. R. Muliari Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci
06	02.12.20	Revisione metodo per modifica protocollo operativo e inserimento controllo interno.	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa A. Tondo	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli

### **1. Scopo e campo di applicazione**

La procedura ha lo scopo di definire il percorso analitico per la rilevazione di RNA del virus dell'Influenza Aviaria di tipo A mediante one step reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR) in campioni derivanti da specie aviare.

Tipologia di campioni sottoposti ad analisi:

- liquido allantoideo
- omogenato di organi/tessuti
- feci
- stemperato tamponi cloacali
- stemperato tamponi tracheali

Target: segmento 7 del genoma virale del virus dell'influenza aviare codificante per la proteina di matrice M1 e 2.

### **2. Documenti di riferimento**

- Hans G Heine, Adam J Foord, Jianning Wang, Stacey Valdeter, Som Walker, Chris Morrissy, Frank YK Wong and Brian Meehan. Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction. *Virology Journal* 2015, 12:18
- Andrea Laconi, Andrea Fortin, Giulia Bedendo, Akihiro Shibata, Yoshihiro Sakoda, Joseph Adongo Awuni, Emilie Go-Maró, Abdelsatar Arafa, Ali Safar Maken Ali, Calogero Terregino, Isabella Monne. Detection of avian influenza virus: a comparative study of the in silico and in vitro performances of current RT-qPCR assays. *Scientific Reports* 2020, 10(1):8441
- Fascicolo di validazione del metodo VIR018V

### 3. Definizioni e acronimi utilizzati

- **AI:** Avian Influenza
- **CSP:** Centro Servizi alla Produzione dell'IZSve

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 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,
- 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.

Per le modalità di comportamento da tenersi e le operazioni da eseguire per lo svolgimento di test biomolecolari mediante tecniche di PCR far riferimento a descritto nell'allegato "ALL PDP 009 - Istruzione per l'esecuzione di un test diagnostico mediante PCR: buone pratiche di Laboratorio".

#### 4.1 Attrezzature/ Strumenti/ Accessori

- Biglie d'acciaio 5 mm sterili
- Bilancia con risoluzione 1 mg
- Campionatore robotizzato per dispensazione reagenti di PCR (sistema liquid handling) Cas 1200 (Qiagen) (opzionale) e relativi puntali con filtro sterili
- Cappa biologica a flusso laminare
- Centrifuga con rotore per provette da 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml e 0,2 ml, con range di velocità fino a 11000xg
- Congelatore  $\leq -18^{\circ}\text{C}$
- Congelatore  $\leq -70^{\circ}\text{C}$
- Coperchi per 8 barre da utilizzare con lo strumento QIASymphony (8-Rod Covers, Qiagen)
- Elution microtubes CL 96 (Qiagen)
- Estrattore automatico King Fisher Flex (Thermo scientific)
- Estrattore automatico QIASymphonySP (Qiagen), con relativi puntali filter-tips da 200 e 1500  $\mu\text{l}$
- Film ottici adesivi per piastre PCR
- Frigorifero tra  $+ 2^{\circ}\text{C}$  e  $+ 8^{\circ}\text{C}$
- KingFisher 96 plate 200  $\mu\text{l}$ , o analogo prodotto di altra ditta
- KingFisher Deep-Well 96 plate, o analogo prodotto di altra ditta
- KingFisher 96 tip comb for DW Magnets, o analogo prodotto di altra ditta
- Micropipette monocanale da 0,5 a 1000  $\mu\text{l}$  con relativi puntali sterili con filtro (DNase/RNase free)
- Micropipette multicanale da 0,5 a 300  $\mu\text{l}$  con relativi puntali sterili con filtro (DNase/RNase free)
- Microprovetta in PP da 2 ml (Sarstedt)
- Mortaio e pestello sterili
- Omogeneizzatore TissueLyser II (Qiagen)
- Piastra matrix ("Matrix Storage Tubes and Seals" BC Matrix 0.5ml 2D tubes PP,V bottom")

- Piastre ottiche sterili da 96 pozzetti
- Pinze e forbici sterili
- Pipetta da 5 ml
- Pipettatore automatico
- Provette sterili da 50 ml, 15 ml, 5 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml
- Provette in strip ottiche per real time PCR e relativi tappi
- Sample Prep Cartridges, 8-well (Qiagen)
- Strumento per real time CFX 96 Real-Time PCR Detection Systems (Biorad-Rad)
- Vaschette porta reagenti
- Vortex
- Dispositivi di protezione individuale (DPI) indicati al punto 4.3.

Per il corretto utilizzo delle apparecchiature è necessario fare riferimento ai relativi manuali d'uso, che riportano le caratteristiche prestazionali e, ove previste, istruzioni operative (IO e IDD) e procedure di taratura (PDT) per le verifiche periodiche.

#### 4.2 Reagenti/soluzioni/kit diagnostici

Nome prodotto	Fornitore/Specifiche	Conservazione
Acqua ultrapura sterile per biologia molecolare	Commerciale	Temperatura ambiente o a $\leq -18^{\circ}\text{C}$
AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents	Applied Biosystems™ / rRT-PCR	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Buffer ATL	Qiagen Buffer per QIASymphony/DSBIO IOP 090	Temperatura ambiente
Etanolo 70%	Commerciale /DSBIO IOP 007/SVRIOP19 Estrazione manuale RNA	Temperatura ambiente
Etanolo assoluto 96-100%	Commerciale	Temperatura ambiente
intype IC-RNA	Indical Bioscience/ Controllo interno /ALL PDP 281	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Isopropanolo assoluto	Commerciale	Temperatura ambiente
MagMAX Pathogen RNA DNA kit	Applied Biosystems / Estrazione automatizzata ALL PDP 282	Temperatura ambiente, Beads conservate tra + $2^{\circ}\text{C}$ e + $8^{\circ}\text{C}$ , Carrier e enhancer a $\leq -18^{\circ}\text{C}$
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel/ Estrazione manuale RNA ALL PDP 023	Temperatura ambiente ad esclusione della DNasi che si conserva tra + $2^{\circ}\text{C}$ e + $8^{\circ}\text{C}$ liofilizzata e a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ una volta ricostituita
PBS antibiotato sterile	Centro servizi alla produzione (CSP)	Tra + $2^{\circ}\text{C}$ e + $8^{\circ}\text{C}$
Polvere di quarzo	Commerciale	Temperatura ambiente
Primer senso IVA D161M	Commerciale 5'-AGATGAGYCTTCTAACCGAGGTCG-3'	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Primer antisenso IVA D162M1	Commerciale 5'- TGCAAAAACATCYTCAAGTCTCTG -3'	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Primer antisenso IVA D162M2	Commerciale	$\leq -18^{\circ}\text{C}$

	5'- TGCAAACACATCYTCAAGTCTCTG -3'	
Primer antisenso <b>IVA D162M3</b>	Commerciale 5'- TGCAAAGACATCYTCAAGTCTCTG-3'	≤ -18°C
Primer antisenso <b>IVA D162M4</b>	Commerciale 5'- TGCAAATACATCYTCAAGTCTCTG -3'	≤ -18°C
Primer senso <b>IC-11F</b>	Commerciale 5'-CAGCCACAACGTCTATATCATG-3'	≤ -18°C
Primer antisenso <b>IC-2R</b>	Commerciale 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3'	≤ -18°C
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit	Qiagen/ Estrazione di acidi nucleici con estrattore automatico QIASymphony/DSBIO IOP 090	Temperatura ambiente
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen/ Estrazione manuale RNA/ ALL PDP 083	Temperatura ambiente ad esclusione del Carrier RNA che, una volta risospeso, viene aliquotato e conservato a ≤ -18°C
RNA estratto da antigene di influenza aviare (non sottotipo H5-H7-H9)	Controllo positivo di PCR (PTC) prodotto in laboratorio / DSBIO IOP 073	≤ -70°C
Sonda <b>AI IVA MA</b>	Commerciale FAM-5'- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA -3'- TAMRA	≤ -18°C
Sonda <b>IC</b>	Commerciale CY5-5'-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA- 3'-BHQ2	≤ -18°C
TE pH 8 (soluzione buffer sterile)	Centro servizi alla produzione (CSP) o commerciale	Temperatura ambiente
Disinfettante per superfici (Es. Virkon 1%, Sodio ipoclorito 0,6% o analogo disinfettante)	Commerciale/ Pulizia e disinfezione delle superfici/ DSBIO IOP 007 oppure SVR IOP 020	Temperatura ambiente

Note: i primer liofilizzati vengono ricostituiti in TE o acqua ultrapura sterile per biologia molecolare alla concentrazione di 100 µM; successivamente vengono ulteriormente diluiti in TE o acqua ultrapura sterile per biologia molecolare alla concentrazione d'uso e conservati a temperatura ≤ -18°C. Le sonde liofilizzate vengono ricostituite in TE o acqua ultrapura sterile per biologia molecolare e diluite in base alla concentrazione d'uso

### 4.3 Norme di sicurezza

Accesso ai laboratori e norme di comportamento	
In laboratorio è obbligatorio l'uso di appositi DPI quali abbigliamento e calzature specifiche	
Fasi di processo	Misure di prevenzione da applicare
Prelievo del materiale conservato in congelatore $\leq -70^{\circ}\text{C}$	Maneggiare i campioni congelati con guanti antifreddo
Preparazione del campione clinico per analisi biomolecolari	Utilizzare guanti monouso e maneggiare il campione sotto cappa di sicurezza biologica. Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con sapone disinfettante
Estrazione acidi nucleici	Eeguire tutte le operazioni sotto cappa a flusso laminare, utilizzare guanti monouso e se necessario la mascherina
Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici	Utilizzare guanti monouso
Preparazione e posizionamento campioni nella piattaforma real time	Utilizzare guanti monouso
Apparecchiatura robotizzata per dispensazione reagenti di PCR	Lo strumento può essere utilizzato solo da personale addestrato. Abbassare lo schermo di protezione. Non introdurre le mani durante il funzionamento.
Per tutte le fasi di processo	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

### 4.4 Modalità operative

#### 4.4.1 Conservazione campioni

I tamponi stemperati, i liquidi allantoidei, i campioni di organi o feci e i relativi omogenati vengono conservati in frigorifero tra  $+ 2^{\circ}\text{C}$  e  $+ 8^{\circ}\text{C}$  fino alla fine delle analisi relative e conseguente emissione di esito. Successivamente i campioni vengono conservati in congelatore a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  fino alla loro eliminazione se negativi o archiviazione se positivi.

È possibile estrarre l'RNA con due modalità diverse: manuale ed automatica, quest'ultima eseguibile con due diversi estrattori (la tracciabilità dello strumento utilizzato in ciascuna seduta è garantita dalle informazioni riportate sul modulo estrazioni).

Eeguire le successive operazioni in un'area dedicata e sotto cappa biologica a flusso laminare.

#### 4.4.2 Preparazione del campione

##### Liquido allantoideo

In una provetta sterile pipettare, mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3.2 e 4.4.4.1, a seconda del metodo di estrazione scelto.

## Organi/tessuti

### a) Omogeneizzazione con pestello e mortaio:

- Utilizzando forbici e pinze sterili prelevare un volume corrispondente a circa 5x5x5 mm di tessuto in esame (\*) (circa 150-200 mg dipendentemente dal tipo di tessuto/organo) e deporlo in un mortaio sterile
- Aggiungere una piccola quantità di polvere di quarzo e sminuzzare il materiale organico con il pestello
- Aggiungere PBS antibiotato sterile in rapporto 1/3 p/v (\*) (circa 450-600 µl), omogeneizzare e trasferire il tutto in una provetta sterile
- Immergere gli strumenti utilizzati in idoneo disinfettante o in sodio ipoclorito 0,6% o analogo disinfettante
- Centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità
- In una provetta sterile pipettare, mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3.1 e 4.4.4.1, a seconda del metodo di estrazione scelto

### b) Omogeneizzazione con TissueLyser II:

- Prelevare un volume corrispondente a circa 5x5x5 mm di tessuto in esame (\*) (circa 150-200 mg dipendentemente dal tipo di tessuto/organo) e deporlo in una provetta sterile;
- Aggiungere una biglia in acciaio sterile da 5 mm;
- Aggiungere PBS antibiotato in rapporto 1/3 p/v (\*) (450-600 µl), (nel caso la quantità di materiale non consentisse il prelievo di una ulteriore aliquota per successive analisi, si procederà all'omogeneizzazione con pestello e mortaio come descritto nel punto precedente)
- Omogeneizzare a 30 Hz per 3 min
- Immergere gli strumenti utilizzati in idoneo disinfettante o in sodio ipoclorito 0,6% o analogo disinfettante
- Centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità
- In una provetta sterile pipettare, mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3.1 e 4.4.4.1, a seconda del metodo di estrazione scelto

(\*) se il campione è composto da un pool di organi o organi molto voluminosi prelevare campioni di tessuto in più punti, tenendo conto che al momento di aggiungere il diluente (PBS antibiotato) il rapporto deve rimanere comunque 1/3 p/v. Per l'omogeneizzazione automatica con TissueLyser, si prevede un massimo di 3 frammenti di tessuto da 5x5x5 mm ciascuno. In quest'ultimo caso, qualora ci sia necessità di prelevare più di tre frammenti, procedere con l'omogeneizzazione manuale.

## Tamponi cloacali/tracheali

- In una provetta sterile aggiungere PBS antibiotato sterile in base alla numerosità dei tamponi:
  - 600 µl per tampone singolo
  - 750 µl da 2 a 5 tamponi (1,5 ml se i tamponi sono spessi)
  - 1,5 ml da 6 a 10 tamponi (3 ml se i tamponi sono spessi)
- Stemperare accuratamente il/i tampone/i nel PBS antibiotato sterile
- Miscelare la sospensione mediante vortex
- In una provetta sterile pipettare mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3.1, 4.4.3.2, 4.4.4.1 e 4.4.4.2 a seconda del metodo di estrazione scelto.

## Feci

- Diluire le feci in rapporto 1/4 p/v in PBS antibiotato. Risospendere le feci accuratamente usando il vortex



- Centrifugare alla max velocità per 30 secondi
- In una provetta sterile pipettare, mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3.1 e 4.4.4.1 a seconda del metodo di estrazione scelto

#### **4.4.3 Estrazione RNA manuale**

Eeguire le successive operazioni in un'area dedicata sotto cappa biologica a flusso laminare.

##### **4.4.3.1 Estrazione con kit commerciale Nucleospin® RNA (Macherey Nagel)**

Kit per l'estrazione di RNA da omogenati d'organo, feci e tamponi (tracheali/cloacali)

- Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le raccomandazioni riportate nell'allegato "ALL PDP 023 - RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)"
- Per ogni campione miscelare 300 µl di Lysis Buffer RA1 con 300 µl di etanolo (70%) ed unire 6 µl di intype IC-RNA (corrispondono a 1/10 v/v di volume di eluizione come indicato nell'allegato ALL PDP 281 –intype IC-RNA Handbook)
- Aggiungere 100 µl di campione preparato come indicato al paragrafo 4.4.2
- Proseguire in conformità alle specifiche indicate nell'allegato ALL PDP 023: seguire il protocollo RNA isolation User manual paragrafo 5.1: "RNA purification from cultured cells and tissue" del kit Nucleospin® RNA" (ALL PDP 023) da step 5 a step 9
- Allestire, insieme ai campioni da sottoporre ad analisi, un campione che funga da controllo negativo di processo (NPC). Tale controllo sarà costituito da 100 µl di PBS antibiotato sterile o Lysis Buffer miscelato con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β-mercaptoetanol) e processato come descritto nel paragrafo 5.1 "RNA purification from cultured cells and tissue" del kit Nucleospin® RNA (ALL PDP 023 da step 5 a step 9)
- L'eluato contenente RNA viene conservato a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  fino al suo utilizzo (oppure a temperatura +2 e +8°C nel caso di utilizzo immediato)

##### **4.4.3.2 Estrazione con kit commerciale kit QIAamp Viral RNA (Qiagen)**

Kit per l'estrazione di RNA da liquido allantoideo e tamponi (tracheali/cloacali).

- Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le raccomandazioni riportate nell'allegato "ALL PDP 083 – QIAamp viral RNA mini Handbook"
- Preparare la miscela di buffer AVL e carrier RNA secondo l'allegato ALL PDP 083 avendo cura di sottrarre al volume ottenuto il volume necessario di intype IC-RNA pari a 6 µl per ogni campione da processare
- Aggiungere intype IC-RNA pari a 6 µl per ogni campione da processare
- Aggiungere 140 µl di campione, preparato come indicato al paragrafo 4.4.2, e proseguire secondo quanto descritto nel paragrafo "Protocol: Purification of Viral RNA (Spin Protocol)" dal punto 3 come da ALL PDP 083
- Allestire, insieme ai campioni da sottoporre ad analisi, un campione che funga da controllo negativo di processo (NPC): tale controllo sarà costituito similmente ai campioni diagnostici sostituendo il volume di campione con 140 µl di PBS antibiotato sterile o buffer di lisi AVL e processato come da ALL PDP 083. L'eluato contenente RNA viene conservato a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  fino al suo utilizzo (oppure a temperatura tra + 2°C e + 8°C nel caso di utilizzo immediato).

N.B. Le informazioni inerenti l'estrazione sono riportate in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO MOD 032 "Foglio di lavoro per estrazione" o "SVR MOD 015 "estrazione acidi nucleici" o analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

#### 4.4.4 Estrazione RNA automatica

##### 4.4.4.1 Estrazione automatica con sistema QIAasymphonySP

Kit per l'estrazione di acidi nucleici da tutte le tipologie di matrice elencate al paragrafo 4.4.2.

- Prelevare 300 µl di campione preparato secondo le indicazioni del paragrafo 4.4.2 e trasferirlo in provette sterili
- Aggiungere 250 µl di Lysis Buffer ATL
- Procedere con l'estrazione dei campioni come descritto nella istruzione DSBIO IOP 090 QIAasymphony SP che fa parte integrante di questa procedura

L'eluato contenente RNA viene conservato a ≤ -70°C fino al suo utilizzo (oppure a temperatura + 2°C e + 8°C nel caso di utilizzo immediato).

N.B. Le informazioni inerenti l'estrazione sono riportate in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO MOD 032 Foglio di lavoro per estrazione" o "SVR MOD 015 estrazione acidi nucleici" o analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

##### 4.4.4.2 Estrazione automatica con sistema King Fisher Flex

Kit per l'estrazione di acidi nucleici da tamponi.

- Ricostituire i reagenti Wash Solution 1 e 2 secondo quanto indicato nel "ALL PDP 282 MagMAX Pathogen RNA DNA kit", sezione "Prepare the reagents"
- Preparare la Lysis/ Binding Solution per low-cell-content samples (200 µl) secondo quanto riportato in tabella 1

**Tabella 1: Preparazione Mix Lysis/Binding Solution**

Ordine di caricamento	Reagente	Volume x 1 campione (200 µl)	Volume x .... campioni
1	Lysis/Binding Solution Concentrato	250 µl	... µl
2	Carrier RNA (µg/µl)	2 µl	... µl
3	Intype IC- RNA	9 µl	... µl
4	Isopropanolo 100%	250 µl	... ml
Volume totale Mix Lysis/Binding solution		<b>511 µl</b>	... µl

- Preparare la Bead Mix secondo quanto indicato nel "ALL PDP 282 MagMAX Pathogen RNA DNA kit", sezione "Prepare the reagents"
- Allestire le piastre per i campioni e per i reagenti secondo quanto indicato nel "ALL PDP 282 MagMAX Pathogen RNA DNA kit", "Section 1 Low-Cell-Content Samples", "Purify the nucleic acid", per sistema "MME-96 processor"
- Selezionare sullo strumento il protocollo MagMAX\_Pathogen (4462359\_DW\_HV o MagMAX\_Pathogen\_High volume 96 DW);
- Inserire un copribarre magnetiche (Tip comb) in una piastra Deep Well;
- Posizionare la piastra nel carosello nella posizione resa disponibile dallo strumento quando sul display compare la scritta "Tip plate", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start;



- Posizionare la piastra Elution nel carosello nella posizione resa disponibile dallo strumento quando sul display compare la scritta "Elution", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start;
- Posizionare la piastra Wash 2 nel carosello nella posizione indicata resa disponibile dallo strumento sul display compare la scritta "Wash 2", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start;
- Posizionare la seconda piastra Wash 2 nel carosello nella posizione resa disponibile dallo strumento quando sul display compare la scritta "Wash 2", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start;
- Posizionare la piastra Wash 1 nel carosello nella posizione resa disponibile dallo strumento quando sul display compare la scritta "Wash 1", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start;
- Posizionare la seconda piastra Wash 1 nel carosello nella posizione resa disponibile dallo strumento quando sul display compare la scritta "Wash 1", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start;
- Posizionare la piastra contenete i campioni nel carosello nella posizione resa disponibile dallo strumento quando sul display compare la scritta "Sample plate", assicurarsi che la piastra sia posizionata nell'orientamento corretto, e premere start.

Durante la fase di estrazione con sistema King fisher Flex allestire, con la stessa procedura dei campioni in analisi, un campione che funga da negativo di processo (NPC) (vedi punto 4.4.5).

La disposizione dei campioni è riportata nel modulo "DSBIO MOD 032 Foglio di lavoro per estrazione" o analogo di struttura.

L'eluato contenente RNA viene conservato a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  fino al suo utilizzo (oppure a temperatura  $+ 2^{\circ}\text{C}$  e  $+ 8^{\circ}\text{C}$  nel caso di utilizzo immediato).

#### 4.4.5 Predisposizione dei controlli/materiali di riferimento

Per ogni seduta analitica vengono predisposti i seguenti controlli:

- **Controllo negativo di processo (NPC)** costituito da PBS antibiotato sterile o Buffer di lisi processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione.
- **Controllo positivo di PCR (controllo di amplificazione, PTC)** costituito da RNA estratto da antigene di influenza aviaria secondo le modalità descritte nei paragrafi 4.4.3 e 4.4.4 Estrazione RNA manuale o Estrazione RNA automatica.
- **Controllo negativo di PCR (NTC)** aliquota contenente tutti i reagenti necessari alla reazione di amplificazione ad esclusione dell'acido nucleico, sostituito da acqua ultrapura sterile per biologia molecolare
- **Controllo interno (IC)** Controllo Interno esogeno (Intype-IC RNA) aggiunto nella fase di lisi di ogni campione, incluso NPC, in quantità conforme all'indicazione del fornitore pari ad 1/10 v/v di volume di eluizione (es: aggiungere 6  $\mu\text{l}$  di IC per un volume finale di estrazione pari a 60  $\mu\text{l}$  di RNA)

#### 4.4.6 Reazione di retrotrascrizione - amplificazione

La preparazione della miscela dei reagenti necessari alla reazione di retrotrascrizione-amplificazione è effettuata in una cappa dedicata secondo quanto previsto dall'allegato "ALL PDP 011" con le specifiche riportate in tabella 2 e 3.

Preparare la miscela "Internal Control Assay Mix" contenente la sonda e i primers specifici per il controllo interno secondo quanto riportato in Tabella 1. E' possibile utilizzare anche volumi multipli rispetto a quelli riportati in Tabella 1.

**Tabella 2: Internal Control Assay Mix**

REAGENTE	QUANTITA'
IC-11F (100 µM)	5 µl
IC-2R (100 µM)	5 µl
IC-probe (100 µM)	3,75 µl
TE pH 8.0	186,25 µl
TOT	200 µl

Preparare la miscela di reazione contenente i reagenti necessari alla reazione di rRT-PCR secondo le indicazioni riportate in tabella 3:

- Scongellare i reagenti, mescolarli delicatamente e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi;
- In una provetta sterile preparare la miscela di reazione aggiungendo i reagenti indicati in tabella 3, ad eccezione dell'RNA. I volumi, calcolati in base alla quantità prevista per singola reazione, vanno moltiplicati per il numero complessivo di campioni da analizzare (inclusi i controlli ed un campione addizionale);
- Miscelare accuratamente i reagenti mediante vortex e centrifugare per pochi secondi;
- Aliquotare 20 µl di miscela per ogni campione in piastra oppure provette in strip ottiche sterili;
- In alternativa a quanto sopra descritto è possibile eseguire la preparazione della miscela dei reagenti necessari alla reazione di retrotrascrizione-amplificazione con il campionatore robotizzato, per la dispensazione dei reagenti di PCR (sistema di liquid handling tipo Cas 1200), seguendo le istruzioni riportate nel manuale d'uso dell'apparecchiatura o in analoghi documenti di struttura, "SVR IOP 14 Utilizzazione Cas 1200".

**Tabella 3: Concentrazioni e volumi dei reagenti relativi alla reazione di rRT-PCR**

REAGENTE	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
Acqua ultrapura sterile	/	/	0,51
2x master mix		1X	12,5
IVA D161M	20 µM	900 nM	1,125
IVA D162M1	10 µM	225 nM	0,56
IVA D162M2	10 µM	225 nM	0,56
IVA D162M3	10 µM	225 nM	0,56
IVA D162M4	10 µM	225 nM	0,56
IVA MA	10 µM	250 nM	0,625
Internal Control Assay Mix			2
RT-PCR Enzyme Mix			1
VOLUME TOTALE	Vortexare la mix per pochi secondi e centrifugare brevemente, distribuirli in volumi di 20 µl in piastra oppure provette in strip ottiche per PCR da 0,2 ml		20
VOLUME CAMPIONE RNA	Aggiungere RNA nelle rispettive provette		5
VOLUME FINALE DI REAZIONE			25

Procedere con l'aggiunta dell'RNA estratto dai campioni da sottoporre a rRT-PCR in una cappa dedicata alla manipolazione degli acidi nucleici. Predisporre il caricamento prima dell'RNA estratto dei campioni incogniti da sottoporre ad analisi, poi il controllo negativo di processo (NPC), il controllo negativo di PCR (NTC) e infine il controllo positivo PCR (PTC). Riportare lo schema di caricamento sul modulo specifico di struttura.

- Aggiungere ad ogni provetta 5 µl di RNA (nel caso del controllo NTC, verranno aggiunti 5 µl di acqua ultrapura); programmare la piattaforma real time secondo le condizioni di amplificazione riportate in tabella 4).
- Disporre le provette all'interno dello strumento ed avviare il programma che soddisfi il profilo indicato in tabella 4. **NOTA:** nel caso di strumento in modalità stand-alone impostare la lettura della fluorescenza su "all channels"

**Tabella 4: Profilo termico di amplificazione**

Fase	Temperatura/Tempo	N. cicli
Retrotrascrizione	45°C/10 min	1
Attivazione Taq polimerasi	95°C/10 min	1
Denaturazione	95°C/15 sec	45
Annealing*	60°C/45 sec	

**\*Acquisizione della fluorescenza (Data Collection):**

**FAM (6 -Fluorescein Phosphoramidite)** eccitazione 470nm e lettura della fluorescenza a 510 nm

**Cy5 (Cyanine5)** eccitazione 625 nm e lettura della fluorescenza a 660nm

Le condizioni di PCR così come la data, il target, il numero univoco identificativo dei campioni analizzati, il loro ordine di caricamento sono riportati in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO MOD 037 Protocollo master mix real time PCR" o "SVR MOD 032 Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time" o analogo modulo di struttura che viene conservato ai fini della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

#### 4.4.7 Rilevazione del prodotto di amplificazione

Al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati dal CFX manager software Bio-Rad o dal CFX maestro software Bio-Rad. Impostare la threshold manualmente per entrambi i target (gene M e IC) sopra al rumore di fondo.

I risultati ottenuti sono riportati in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO MOD 037 Protocollo master mix real time PCR" o "SVR MOD 032 Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time" o analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

#### 4.4.8 Isolamento virale e tipizzazione (opzionale)

I campioni che risultano POSITIVI (vedi p. 4.5), dopo valutazione del Dirigente Responsabile possono essere inviati per le successive analisi di isolamento virale ed eventuale tipizzazione con apposito foglio di lavoro, al Centro di Referenza Nazionale per AI/ND presso il laboratorio virologia speciale della struttura SCS6, secondo le indicazioni dell'istruzione "IZS IDD 069 Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria".

### 4.5 Espressione dei risultati

La prova di amplificazione viene considerata **CONFORME** se i controlli predisposti danno i risultati attesi:

- **Controllo positivo di PCR (PTC):** incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione) del reporter associato alla sonda IVA MA previsto ad un valore Ct inferiore a 21;
- **Controllo negativo di PCR (NTC):** assenza della curva di amplificazione; assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del reporter associato alle sonde;
- **Controllo negativo di processo (NPC):** assenza della curva di amplificazione, assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del reporter associato alla sonda IVA MA. Incremento regolare della fluorescenza associato alla sonda IC-probe previsto ad un valore Ct inferiore a 28;
- **Controllo interno (IC):** incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione) previsto ad un valore Ct inferiore a 28.

La prova di amplificazione viene considerata **NON CONFORME** se i controlli predisposti **non** danno i risultati attesi.

In questo caso la prova deve essere ripetuta partendo dalla:

- reazione di amplificazione, se il controllo positivo di amplificazione è risultato non conforme;
- reazione di amplificazione, avendo cura di cambiare i reagenti, se il controllo reagenti è risultato non conforme;
- estrazione, se il controllo negativo di processo è risultato non conforme.

In caso di positività gene M e IC negativo, il campione viene considerato conforme e l'esito della analisi è **POSITIVO** (vedi sotto).

In caso di negatività o di esito dubbio per gene M e IC non conforme, procedere secondo quanto indicato in Tabella 5.

**Tabella 5 Esempificativa in caso di IC non conforme**

CAMPIONE	IC	AZIONE
Negativo o dubbio	Ct >28	Diluire l'RNA estratto in rapporto 1:10 in acqua ultrapura sterile (DNase/RNase free) e ripetere la reazione di amplificazione (4.4.6); se nuovamente non conforme ripetere l'estrazione (4.4.3 o 4.4.4)
Negativo	Negativo	Ripetere estrazione (4.4.3 o 4.4.4)

**Il campione viene definito ed espresso sul rapporto di prova come POSITIVO** quando si ha un incremento regolare della fluorescenza del reporter FAM associato alla sonda IVA MA associato ad un valore Ct inferiore a 36 cicli soglia;

**Il campione viene definito ed espresso sul rapporto di prova come NEGATIVO** quando non si rileva un aumento di fluorescenza o una curva di amplificazione irregolare legata allo specifico fluoroforo della sonda IVA MA in associazione con un aumento della fluorescenza legata al fluoroforo della sonda IC-probe con valore Ct inferiore a 28.

Il **campione** viene definito **DUBBIO** quando si rivela un aumento di fluorescenza legato alla sonda IVA MA regolare ma debole, con un valore Ct compreso tra 36 e 45. Interpellare il Responsabile di laboratorio o il suo delegato, per decidere su come procedere.

Qualora vi fossero dei dubbi sull'interpretazione del risultato, viene interpellato il Responsabile di laboratorio o il suo delegato, per decidere su come procedere.

#### 4.6 Caratteristiche del metodo

Per le caratteristiche del metodo fare riferimento a quanto dichiarato nel modulo "IZS MOD 031 - Dichiarazione di validazione/verifica delle prestazioni ed idoneità del metodo di prova"

#### 4.7 Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento al dedicato allegato 05 della IO IZSV 033 "Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di biologia molecolare", 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 dal Manuale della Qualità.

### 5. Documenti allegati e/o correlati

- **Manuale della Qualità MQI:**
- **PR 01:** Processo Analitico
- **PR GAPP:** gestione apparecchiature
- **PR GRMR:** gestione reagenti, kit e materiali di riferimento
- **PR 06:** gestione delle competenze del personale
- **PR SVVP:** Gestione sviluppo, validazione e verifica prestazione dei metodi di prova
- **ALL 005 (IO IZSV 033):** Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di biologia molecolare
- **IO IZS 033:** Modalità operative per la gestione dei rifiuti derivanti dall'attività lavorativa
- **IZS IDD 069 :** Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria
- **IZS MOD 031 (PR SVVP):** Dichiarazione di validazione/verifica delle prestazioni ed idoneità del metodo di prova
- **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 023:** RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)
- **ALL PDP 083:** QIAamp Viral RNA Mini Handbook
- **ALL PDP 281:** intype IC-RNA Handbook
- **ALL PDP 282:** MagMAX Pathogen RNA DNA kit
- **DSBIO IOP 007:** Istruzione per la preparazione delle soluzioni in uso presso i laboratori delle SCS5 e SCS6
- **DSBIO IOP 038:** Gestione dei Materiali di Riferimento e ceppi virali
- **DSBIO IOP 073:** Gestione dei materiali di riferimento per biologia molecolare
- **DSBIO IOP 090:** Utilizzo dell'estrattore automatico QIA Symphony SP
- **DSBIO MOD 032:** Foglio di lavoro per estrazione
- **DSBIO MOD 037:** Protocollo Master mix Real time PCR
- **SVR IOP 14:** Utilizzazione Cas 1200
- **SVR IOP 19:** Preparazione delle soluzioni
- **SVR IOP 020:** Disinfezione delle aree e delle superfici di lavoro
- **SVR MOD 015:** Estrazione acidi nucleici
- **SVR MOD 032:** Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time