

## 1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice + Specie	Tecnica di prova
Segmento 7 del genoma del virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIV) codificante per la proteina di matrice M	Isolati virali, organi/tessuti, feci e tamponi da specie aviarie e di mammifero, tamponi nasali/faringei umani, RNA/DNA estratto dalle suddette matrici	One step reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR)
Scopo della prova		
Analisi di screening applicabile a volatili domestici e selvatici, e a campioni da mammifero, ivi compresi soggetti umani esposti ad AIV.		

## 2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 018 2024 Rev. 8

Bibliografia di riferimento:

- H.G. Heine, A.J. Foord, J. Wang, S. Valdeter, S. Walker, C. Morrissy, F.Y.K. Wong, B. Meehan. Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction. *Virology* 12:18, 2015. doi: 10.1186/s12985-015-0250-3
- A. Laconi, A. Fortin, G. Bedendo, A. Shibata, Y. Sakoda, J.A. Awuni, E. Go-Maró, A. Arafa, A.S. Maken Ali, C. Terregino, I. Monne. Detection of avian influenza virus: a comparative study of the in silico and in vitro performances of current RT-qPCR assays. *Sci Rep* 10(1):8441, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-64003-6
- B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirmer, M. Beer. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 136(1-2):200-9, 2006. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020
- WOA - World Organization for Animal Health (ex OIE), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023, Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (Version adopted in May 2021)

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR 018V

## 3. Attrezzature, apparecchiature e consumabili

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 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml e 0,2 ml con velocità fino a 18000 × g
- Centrifuga con rotore per piastre da 96 pozzetti con velocità di almeno 5000 × g
- Piattaforma per real time PCR CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad) e relativi consumabili, o analogo strumento
- Sistema robotizzato per dispensazione di liquidi (liquid handling system) Cas 1200 (Qiagen) oppure Myra (Bio Molecular Systems) (opzionale) e relativi puntali con filtro sterili

## 4. Reagenti, soluzioni, kit diagnostici e materiali di riferimento

Dotazione base di un laboratorio di biologia molecolare "ALL PDP 279 E", con le integrazioni e/o specifiche riportate:

Prodotto	Fornitore / Specifiche	Conservazione
AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents	Applied Biosystems™/rRT-PCR	≤ -18°C
Primer senso IVA D161M	Commerciale 5'-AGATGAGYCTTCTAACCGAGGTCG-3'	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso
Primer antisenso IVA D162M1	Commerciale 5'-TGCAAAAACATCYTCAAGTCTCTG-3'	
Primer antisenso IVA D162M2	Commerciale 5'-TGCAAACACATCYTCAAGTCTCTG-3'	
Primer antisenso IVA D162M3	Commerciale 5'-TGCAAAGACATCYTCAAGTCTCTG-3'	
Primer antisenso IVA D162M4	Commerciale 5'-TGCAAATACATCYTCAAGTCTCTG-3'	
Sonda IVA MA	Commerciale FAM-5'-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-3'- TAMRA/BHQ1/BBQ1	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzata, ≤ -18°C se risospesa. Conservare al buio
Primer senso IC-11F	Commerciale 5'-CAGCCACAACGTCTATATCATG-3'	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso
Primer antisenso IC-2R	Commerciale 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3'	
Sonda IC	Commerciale CY5-5'-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-3'- BHQ2	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzata, ≤ -18°C se risospesa. Conservare al buio
Materiali di riferimento: RNA estratto da antigene di influenza aviare (non sottotipo H5-H7-H9)	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target AIV estratto da antigene prodotto e certificato dalla SCS6 - U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione, e opportunamente diluito secondo i criteri di accettabilità stabiliti al par. 8.1	≤ -70°C
Intype IC-RNA	Indical Bioscience/Controllo positivo di PCR (PTC) per il controllo interno/" <b>ALL PDP 281</b> " - Handbook intype IC-RNA"	≤ -18°C

#### 4.1 Preparazione delle soluzioni

Prodotto	Modalità preparazione	Conservazione
Oligonucleotidi (primers e sonde)	Risospendere secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice con TE pH 8 o acqua per biologia molecolare nuclease-free per ottenere una soluzione 100 µM. Successivamente portare alle concentrazioni d'uso	≤ -18°C Conservare le sonde al buio
Internal control assay pre-mix	Unire i seguenti reagenti nei volumi indicati per ottenere 200 µl di pre-mix: <ul style="list-style-type: none"> <li>TE pH 8.0: 186,25 µl</li> <li>Primer IC-11F (100 µM): 5 µl</li> <li>Primer IC-2R (100 µM): 5 µl</li> <li>Sonda IC (100 µM): 3,75 µl</li> </ul>	≤ -18°C, al buio

## 5. Verifiche preliminari

### Condizioni ambientali

- Non sono richieste condizioni ambientali specifiche affinché la prova venga eseguita correttamente

### Condizioni strumentali

- Verificare che gli strumenti necessari per la prova siano correttamente funzionanti, che le attività di manutenzione siano state eseguite e che gli strumenti di misurazione siano in corretto stato di conferma metrologica.

### Periodo di stabilizzazione richiesto per il campione

- Scongelare completamente il campione prima di iniziare la prova, se conservato a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$
- 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

Conservare il campione secondo:

- "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"

Nel dettaglio:

- Isolati e campioni clinici 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 all'emissione dell'esito, i campioni positivi e/o di interesse biologico possono essere archiviati in congelatore a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$
- Gli acidi nucleici estratti vengono conservati a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  fino all'utilizzo (oppure a temperatura  $+2^{\circ}\text{C}$  e  $+8^{\circ}\text{C}$  nel caso di utilizzo immediato).

## 7. Norme di sicurezza

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
Prelievo del materiale conservato in congelatore $\leq -70^{\circ}\text{C}$	Maneggiare i campioni congelati con guanti antifreddo
Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici	Utilizzare guanti monouso
Utilizzo dell'apparecchiatura robotizzata per dispensazione master mix e acidi nucleici	Abbassare lo schermo di protezione. Non introdurre le mani durante il funzionamento
Posizionamento campioni nella piattaforma per real-time PCR e avvio dello strumento	Utilizzare guanti monouso
Per tutte le fasi di processo	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

## 8. Modalità operative

Vedere “**ALL PDP 009** - Istruzione per l’esecuzione di un test diagnostico mediante PCR: Buone pratiche di laboratorio”, e “**ALL PDP 011** - Principi generali per l’esecuzione delle tecniche di prova di biologia molecolare basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)”.

### PREPARAZIONE CAMPIONE

Tracciabilità seduta analitica: “**IZS MOD 291 A** - Disposizione dei campioni da sottoporre a estrazione o a reazione di amplificazione”, “**IZS MOD 291 E** - Elenco dei campioni amplificati o pretrattati”.

Seguire le indicazioni riportate in “**ALL PDP 1000** - Preparazione del campione ed estrazione degli acidi nucleici per la rilevazione con metodi molecolari del virus dell’Influenza Aviaria (AIV) e del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1)”.

### ESTRAZIONE ACIDO NUCLEICO

Tracciabilità seduta analitica: **IZS MOD 291 A**, “**IZS MOD 291 B** - Estrazione acidi nucleici”.

Seguire le indicazioni riportate in **ALL PDP 1000**, prevedendo l’utilizzo del controllo interno intype IC-RNA (Indical Bioscience). Su decisione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato, il metodo può essere utilizzato senza controllo interno esogeno per attività sorveglianza attiva e prolungata ad elevato impatto economico limitatamente ai campioni prelevati da esemplari appartenenti all’avifauna selvatica.

### CONTROLLI

Tracciabilità seduta analitica: **IZS MOD 291 A**, **IZS MOD 291 B**, “**IZS MOD 291 C** - Amplificazione acidi nucleici - Reazione di PCR Real Time”, **IZS MOD 291 E**.

- **PTC** (controllo positivo di amplificazione): campione costituito da RNA estratto da antigene di influenza aviaria in assenza di IC-RNA secondo **ALL PDP 1000** e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
- **NTC** (controllo negativo di amplificazione): campione privo di RNA target (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
- **IC** (controllo interno esogeno): intype IC-RNA (Indical Bioscience) aggiunto durante la fase di estrazione al campione lisato secondo **ALL PDP 1000**, e co-amplificato con il target virale in modalità duplex
- **NPC** (controllo negativo di processo): campione negativo per AIV (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free o PBS antibiotato) contenente intype IC-RNA (Indical Bioscience) e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione secondo **ALL PDP 1000**
- **PTC per IC** (controllo positivo di amplificazione per IC-RNA): campione costituito da intype IC-RNA (Indical Bioscience) diluito 1:100 in acqua per biologia molecolare nuclease-free e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione

## ANALISI

Tracciabilità seduta analitica: “**ALL PDP 328** - Composizione delle pre-mix e delle mix, definizione dei profili termico e di restrizione e indicazione dei target oggetto di PCR multiplex – agg. 0”, **IZS MOD 291 A, IZS MOD 291 C, IZS MOD 291 E.**

### 1) Preparazione Mastermix

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione*
Nuclease free water			0,51
2X RT-PCR Buffer	2X	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 pre-mix			2
25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	1
Volume totale mix	Miscelare la mix per pochi secondi, centrifugare brevemente e distribuirla in volumi di 20 µl per ciascun campione		20
Templato	Aggiungere il templato nelle rispettive provette		5
Volume finale			25

E' possibile distribuire la master mix e il templato manualmente oppure mediante campionatore robotizzato per la dispensazione di liquidi (Cas 1200, Qiagen oppure Myra, Bio Molecular Systems), seguendo le indicazioni riportate nell'istruzione operativa “**IZS IDD 285** - Utilizzazione del dispensatore automatico CAS-1200” o **IZS IDD 293** - Utilizzo di MYRA TM (Bio Molecular Systems, Resnova).

### 2) Amplificazione

Profilo di amplificazione standard		
FASE	TEMPERATURA / TEMPO	n° CICLI
Reverse transcription	45°C/10 min	1
RT inactivation/initial denaturation	95°C/10 min	1
Denaturation	95°C/15 sec	45
Annealing/Extension (*)	60°C/45 sec	

(\*) acquisizione della fluorescenza per i canali:

- FAM 515-530λ – target AIV
- Cy5 675-690λ – controllo interno esogeno

### 3) Rilevazione del prodotto

Al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati dal CFX manager software Bio-Rad o dal Bio-Rad CFX maestro. Per entrambi i target, la *threshold* può essere impostata in modo automatico o manualmente posizionandola sopra al rumore di fondo, all'inizio della fase esponenziale delle curve di

amplificazione (AIV circa 100 RFU; IC circa 50 RFU; i valori possono variare in funzione del rumore di fondo tipico di ogni seduta/lotto di sonda).

Leggere i risultati secondo quanto riportato ai paragrafi 8.1 e 8.2.

### ATTIVITÀ POST PROCEDURA

**Determinazione del sottotipo:** I campioni per i quali è stato rilevato il target AIV (vedi p. 8.2) vengono sottoposti ad ulteriori procedure per l'identificazione di:

- Sottotipi influenzali H5 e H7 (es. **PDP VIR 144, PDP VIR 143, PDP VIR 1004**) presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche comparate (DSBIO) con sede a Legnaro (PD) e il laboratorio SCT1 Sezione Verona, ai fini di una rapida identificazione dei focolai e della messa in atto delle misure di controllo previste
- Sottotipi influenzali non-H5, non-Ha e determinazione del sottotipo NA (es. **PDP VIR 1004**) presso i laboratori del DSBIO con sede a Legnaro (PD)

**Invio del campione al centro di referenza:** I campioni analizzati presso il laboratorio SCT1 Sezione Verona per i quali è stato rilevato il target AIV (vedi p. 8.2) indipendentemente dal sottotipo, vengono inviati ai laboratori del DSBIO con sede a Legnaro (PD) per la conferma del risultato, l'esecuzione di ulteriori approfondimenti diagnostici ed eventuale determinazione del sottotipo.

**Isolamento e caratterizzazione genetica:** I campioni per i quali è stato rilevato il target AIV (vedi p. 8.2), dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato possono essere sottoposti a isolamento virale o ad ulteriore caratterizzazione genetica (es. **PDP VIR 005**) presso i laboratori del DSBIO con sede a Legnaro (PD).

#### 8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

Parametro	Risultati attesi	Azione in caso di non conformità
PTC per AIV	Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per AIV caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con $Ct = 27 \pm 3$	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di ripetere la prova solo per i campioni negativi
NTC	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per AIV e per IC (se previsto) ed assenza di curve di amplificazione sigmoideali (o logaritmiche)	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la rRT-PCR. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi
IC (se previsto)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con <math>Ct \leq 30</math>, associato a qualsiasi risultato per AIV</li> <li>• Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per IC ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica), associato a rilevazione di AIV</li> </ul>	In caso di mancata amplificazione o di $Ct > 30$ per IC associato a dubbia o mancata rilevazione di AIV, il campione viene considerato <b>Inadatto</b> (vedi paragrafo 8.2). Tuttavia, è possibile ripetere l'analisi a partire dalla fase di amplificazione, diluendo gli acidi nucleici estratti 1:10 con acqua per biologia molecolare nucleas-free. In alternativa, è possibile ripetere l'analisi a partire dalla fase di estrazione diluendo maggiormente il

		campione biologico secondo le indicazioni riportate in <b>ALL PDP 1000</b>
NPC	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per AIV ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), associata a incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC (se previsto), caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 30	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici. Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> o un suo delegato può decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi
PTC per IC (se previsto)	Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 30	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione solo nel caso in cui nell'intera seduta il controllo interno dei campioni sia non conforme, previo controllo dei reagenti per l'amplificazione di IC e dello stock di IC-RNA utilizzato nella seduta

## 8.2 Espressione dei risultati

### Espressione standard dei risultati (ovvero, impiegando il controllo interno esogeno)

I risultati vengono espressi e riportati nei rapporti di prova con le seguenti modalità:

CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE	RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO	RISULTATO ESPRESSO SUL RDP
<ul style="list-style-type: none"> <li>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per AIV ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), in presenza di IC non conforme</li> <li>Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per AIV caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct &gt; 36, in presenza di IC non conforme</li> </ul>	<b>Inadatto</b>	<b>Inadatto</b>  Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo "valore" di Izilab la motivazione della non idoneità del campione ed eventualmente suggerire un ricampionamento nel campo "note esterne"
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per AIV caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 36, indipendentemente dalla conformità di IC	<b>Positivo</b>	<b>Rilevato</b>
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per AIV ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), in presenza di IC conforme	<b>Negativo</b>	<b>Non rilevato</b>
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per AIV caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct > 36, in presenza di IC conforme	<b>Dubbio</b>	<b>Dubbio</b>  Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo "valore" e "note esterne" di Izilab eventuali commenti o raccomandazioni

**Espressione dei risultati in caso di utilizzo della procedura senza controllo interno esogeno per attività di sorveglianza nell'avifauna selvatica**

I risultati vengono espressi e riportati nei rapporti di prova con le seguenti modalità:

CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE	RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO	RISULTATO ESPRESSO SUL RDP
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per AIV caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct ≤ 36	<b>Positivo</b>	<b>Rilevato</b>
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per AIV ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica)	<b>Negativo</b>	<b>Non rilevato</b>
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per AIV caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct > 36	<b>Dubbio</b>	<b>Dubbio</b> Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo "valore" e "note esterne" di Izilab eventuali commenti o raccomandazioni

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

Nel caso di dubbi interpretativi o risultati non conclusivi, il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato può decidere di ripetere l'analisi a partire dall'estrazione e/o eseguire un test alternativo per la rilevazione del virus dell'influenza aviaria.

**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 degli ambienti di lavoro dei laboratori non BSL3" 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
07	25.02.22	Revisione layout, scorporazione della fase di preparazione del campione e di estrazione nell'ALL PDP 1000, modifica dei controlli e dei criteri di accettabilità	Dr.ssa V. Panzarin Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
08	08.03.24	Revisione layout, estensione campo di applicazione, inserimento strumentazione robotizzata, utilizzo del controllo interno, espressione dei risultati, criteri di accettabilità dei controlli e revisioni formali	Dr.ssa V. Panzarin Dr. A. Fortin	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli