

## 1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Porzione del gene F corrispondente al sito di clivaggio della proteina di fusione del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1)	Isolati virali (tipicamente liquido allantoideo), organi/tessuti, feci, tamponi	One step reverse transcriptase PCR (RT-PCR) e Sequenziamento Sanger e analisi di sequenza

## 2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 1002 2022 Rev. 0

Bibliografia di riferimento:

- A. Kant, G. Koch, D.J. Van Roozelaar, F. Balk, A.T. Huurne. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. Avian Pathol 26(4):837-49, 1997. doi: 10.1080/03079459708419257;
- WOAH (ex OIE) - World Organization for Animal Health, Terrestrial Manual, Chapter 3.3.14. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus) (Version adopted in May 2021).

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR1002V

## 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 pari ad almeno 5000 × g
- Termociclatore per PCR end point S1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, o analogo strumento
- QIAxcel Advanced System (Qiagen) e relativi consumabili (0,2 ml 12-tube strip)

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

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

Prodotto	Fornitore / Specifiche	Conservazione
Antigene di APMV-1 (se il metodo è usato come analisi di prima istanza)	Controllo positivo di processo (PPC) per il target APMV-1/fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione “ <b>DSBIO IOP 038</b> - Gestione dei materiali di riferimento e ceppi virali”	≤ -70°C
AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents	Applied Biosystems™/RT-PCR	≤ -18°C
Primers antisenso NDV_KANT_R_B	Commerciale 5'-GGAGGATGTTGGCAGCATT-3'	≤ -18°C
Primer senso	Commerciale	≤ -18°C

NDV_KANT_F_A	5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3'	
RNA estratto da antigene di APMV-1	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target APMV-1/" <b>DSBIO IOP 073</b> - Gestione dei materiali di riferimento per biologia molecolare"	≤ -70°C
QX DNA Alignment Marker 15bp-3 kb	Qiagen/Elettroforesi automatica su strumento Qiaxcel Advanced System (Qiagen)/" <b>DSBIO IOP 091</b> - Utilizzo dello strumento QIAxcel"	≤ -18°C
QIAxcel DNA High Resolution kit	Qiagen/Elettroforesi automatica su strumento Qiaxcel Advanced System (Qiagen)/" <b>DSBIO IOP 091</b> "	Tra + 2°C e + 8°C; dopo l'apertura conservare a temperatura ambiente cartuccia, wash buffer, separation buffer, olio minerale
QX Size Marker 50-800 bp o da 100-2500 bp (100ng/μl)	Qiagen/Elettroforesi automatica su strumento Qiaxcel Advanced System (Qiagen)/" <b>DSBIO IOP 091</b> "	≤ -18°C

Note: i primer liofilizzati vengono ricostituiti in TE pH 8 o acqua per biologia molecolare nuclease-free per ottenere una concentrazione pari a 100 μM; successivamente vengono ulteriormente diluiti in TE o acqua per biologia molecolare nuclease-free per ottenere la concentrazione d'uso, e conservati a temperatura ≤ -18°C.

## 5. Verifiche da effettuare prima di iniziare la prova

Vedere "**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"

## 6. Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Conservare il campione secondo:

- "**IZS IDD 007** - Modalità di conservazione dei campioni"
- "**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)"

Nel dettaglio:

- Isolati virali, organi/tessuti, feci, tamponi vengono conservati in frigorifero tra + 2°C e + 8°C fino alla fine delle relative analisi e conseguente emissione del rapporto di prova esito
- Successivamente all'emissione del rapporto di prova, 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 tra + 2°C e + 8°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 ≤ -70°C	Maneggiare i campioni congelati con guanti antifreddo
Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici	Utilizzare guanti monouso

Posizionamento campioni nel termociclatore e avvio dello strumento	Utilizzare guanti monouso
Elettroforesi capillare	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)”.

<b>PREPARAZIONE CAMPIONE</b>	Vedere “ <b>ALL PDP 1000</b> ”
------------------------------	--------------------------------

<b>ESTRAZIONE ACIDO NUCLEICO</b>	Moduli per la tracciabilità della seduta: “ <b>DSBIO MOD 032</b> - Foglio di lavoro per estrazione” o analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi. Vedere “ <b>ALL PDP 1000</b> ”, prevedendo l’utilizzo del controllo positivo di processo (PPC) se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza, dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato
----------------------------------	---

<b>PREDISPOSIZIONE CONTROLLI</b>	<b>NPC</b>	Controllo negativo di processo: campione negativo per APMV-1 (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free o PBS antibiotato) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione
	<b>PPC per APMV-1 (se previsto)</b>	Controllo positivo di processo (se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza): campione costituito da antigene di APMV-1 processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione
	<b>NTC</b>	Controllo negativo di amplificazione: campione privo dell’RNA target (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
	<b>PTC per APMV-1</b>	Controllo positivo di amplificazione per APMV-1: campione costituito da RNA estratto da antigene di paramyxovirus aviario di tipo 1 in assenza di controllo interno IC-RNA (vedere “ <b>ALL PDP 1000</b> ”), e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione

### Preparazione Master Mix

Moduli per la tracciabilità della seduta: “**DSBIO MOD 035** - Protocollo master mix PCR, Nested PCR, One step PCR DSBIO” o analogo modulo di struttura.

Sotto cappa biologica a flusso laminare dedicata alla preparazione della mix:

- Scongellare i reagenti indicati in tabella 1, ad eccezione degli enzimi, miscelarli e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi
- In una provetta sterile tipo Eppendorf, preparare la miscela “Master mix per la reazione di RT-PCR” aggiungendo i reagenti nell’ordine indicato in tabella 1, ad eccezione del template; i volumi riportati in tabella sono da intendersi per singola reazione e devono essere moltiplicati per il numero complessivo di campioni da analizzare, inclusi i controlli, ed alcuni campioni addizionali (tipicamente, il 10% del totale dei campioni)
- Miscelare la mix di reazione mediante vortex e centrifugare per pochi secondi
- Aliquotare 20 µl di master mix per ogni campione in piastra, strip oppure provette sterili da 0,2 ml

**Tabella 1:** Master mix per la reazione di RT-PCR

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl x 1 reazione
Nuclease-free water	-	-	5,5
2X RT-PCR Buffer	2X	1X	12,5
NDV_KANT_F_A	10 µM	0,2 µM	0,5
NDV_KANT_R_B	10 µM	0,2 µM	0,5
25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	1
Volume totale master mix			20
Acidi nucleici/RNA			5
Volume finale			25

Sotto cappa biologica a flusso laminare dedicata alla dispensazione del campione:

- Aggiungere 5 µl di template (campioni e controlli)
- Centrifugare per pochi secondi

ANALISI

Reazione di RT-PCR

<b>Amplificazione</b>																								
		<p><b>Tabella 2:</b> Profilo termico di amplificazione</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Fase</th> <th>Temperatura /Tempo</th> <th>N. cicli</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Reverse transcription</td> <td>45°C for 45 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>RT inactivation/initial denaturation</td> <td>94°C for 2 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Denaturation</td> <td>94°C for 1 min</td> <td rowspan="3">40</td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>55°C for 1 min</td> </tr> <tr> <td>Extension</td> <td>72°C for 1 min</td> </tr> <tr> <td>Final extension</td> <td>72°C for 10 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Cooling</td> <td>4°C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>	Fase	Temperatura /Tempo	N. cicli	Reverse transcription	45°C for 45 min	1	RT inactivation/initial denaturation	94°C for 2 min	1	Denaturation	94°C for 1 min	40	Annealing	55°C for 1 min	Extension	72°C for 1 min	Final extension	72°C for 10 min	1	Cooling	4°C	∞
Fase	Temperatura /Tempo	N. cicli																						
Reverse transcription	45°C for 45 min	1																						
RT inactivation/initial denaturation	94°C for 2 min	1																						
Denaturation	94°C for 1 min	40																						
Annealing	55°C for 1 min																							
Extension	72°C for 1 min																							
Final extension	72°C for 10 min	1																						
Cooling	4°C	∞																						
<b>Elettroforesi capillare</b>		<p>Vedere istruzione “<b>DSBIO IOP 091</b> - Utilizzo dello strumento QIAxcel”. Le dimensioni attese del prodotto di amplificazione sono pari a 362 bp.</p> <p>Al termine dell’analisi, il report generato dal software QIAxcel ScreenGel riportante il numero identificativo dei campioni, l’ordine di caricamento e l’immagine del gel, viene allegato al modulo “<b>DSBIO MOD 035</b>” per la tracciabilità della seduta.</p> <p>Nota: in caso di necessità è possibile effettuare l’analisi elettroforetica anche mediante gel di agarosio o di acrilammide, secondo le indicazioni riportate in “<b>ALL PDP 012</b> - Preparazione, corsa elettroforetica, colorazione di gel di acrilammide, di agarosio e di gel precast”. Leggere i risultati secondo par. 8.1 e par 8.2.</p>																						
<b>Sequenziamento Sanger</b>		<p>Modulo per la tracciabilità della seduta: “<b>IZS MOD 143</b> - Scheda accompagnamento campioni per analisi di sequenza”.</p> <p>Vedere allegato “<b>ALL PDP 096</b> – Purificazione dei prodotti di PCR e analisi di sequenza per uso diagnostico”.</p> <p>I campioni che presentano un prodotto di amplificazione dopo l’elettroforesi capillare, vengono inviati unitamente al report generato dal software QIAxcel ScreenGel al Laboratorio genomica e trascrittomica virale della SCS5, secondo le indicazioni dell’istruzione “<b>IZS IDD 160</b> - Modalità di invio dei campioni per sequenziamento condivisione dei risultati”.</p>																						
<b>Analisi di sequenza</b>		<p>Vedere allegato “<b>ALL PDP 096</b>” per l’analisi dei cromatogrammi mediante software SeqScape.</p> <p>L’identificazione di APMV-1 avviene allineando la sequenza nucleotidica ottenuta con le sequenze disponibili nel database GenBank mediante BLAST (<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>), adottando i seguenti parametri di analisi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Web BLAST: Nucleotide BLAST</i></li> <li>• <i>Choose Search set, Database: Standard databases</i></li> <li>• <i>Program selection: Highly similar sequences (megablast)</i></li> </ul> <p>L’identificazione virale di APMV-1 avverrà sulla base della similarità della sequenza incognita rispetto alla sequenza presente nel database che presenta il valore più elevato di “<i>max score</i>” (di solito la prima sequenza dell’elenco in</p>																						

		<p>output dell'analisi BLAST). I risultati possono riportare anche l'indicazione del genotipo e della patogenicità dedotta su base molecolare del ceppo virale sequenziato.</p> <p>L'attribuzione del patotipo velogeno o lentogeno si baserà sull'analisi della sequenza aminoacidica dedotta corrispondente al sito di clivaggio della proteina di fusione di APMV-1. Attraverso il software SeqScape, come da allegato "ALL PDP 096", la sequenza generata sarà allineata e comparata con una sequenza di APMV-1 codificante per la proteina di fusione importata dal database pubblico Genbank. L'interpretazione del patotipo verrà quindi effettuata secondo le indicazioni riportate nel manuale WOA. Nello specifico i virus APMV-1 patogeni per i volatili (velogeni) si riconoscono per il motivo aminoacidico <sup>112</sup>R/K-R-Q/K/R-K/R-R<sup>116</sup> all'estremità C-terminale della proteina F2, e F<sup>117</sup> all'estremità N-terminale della proteina F1, mentre i virus a bassa virulenza (lentogeni) presentano i residui <sup>112</sup>G/E-K/R-Q-G/E-R<sup>116</sup> e L<sup>117</sup>.</p>
--	--	---

<p><b>ATTIVITA' SUCCESSIVE ALL'ESITO</b></p>	<p><b>Tipizzazione, isolamento e sequenziamento</b></p>	<p>I campioni che risultano POSITIVI (vedi p. 8.2), dopo valutazione del <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> possono essere sottoposti ad approfondimenti diagnostici per la caratterizzazione del patotipo virale <i>in vivo</i> (es. <b>PDP VIR 007</b>), o ad ulteriore caratterizzazione genetica.</p> <p>Nel caso di positività in <b>uccelli domestici</b> i campioni possono essere sottoposti ad isolamento virale. In caso di positività in <b>uccelli selvatici</b> l'isolamento (es. <b>PDP VIR 007</b>) verrà effettuato su indicazione del <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u>.</p>
--	---	--

### 8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

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

Parametro	Risultati attesi	Limite/Criteri di accettabilità	Azione in caso NC
Controllo negativo di processo (NPC)	Assenza di banda specifica di circa 362 bp	Negativo	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici
Controllo positivo di processo (PPC) per APMV-1 (se previsto)	Presenza di banda specifica di circa 362 bp	Positivo	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione
Controllo negativo di PCR (NTC)	Assenza banda specifica di circa 362 bp	Negativo	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la RT-PCR
Controllo positivo di PCR (PTC) per APMV-1	Presenza banda specifica di circa 362 bp	Positivo	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC

## 8.2 Espressione dei risultati

### 8.2.1 RT-PCR

CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE	RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO	RISULTATO ESPRESSO SUL RDP
Assenza di un qualsiasi prodotto di amplificazione	<b>Negativo</b>	<b>Negativo</b>
Presenza di un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese e sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
Presenza di bandeggio multiplo o di un prodotto di amplificazione di dimensioni diverse da quelle attese e non sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR	<b>Effettuato*</b>	<b>Effettuato</b>

\*Il Responsabile di laboratorio o un suo delegato può decidere di procedere comunque con il sequenziamento Sanger per definire l'identità del prodotto di amplificazione con dimensioni diverse da quelle attese.

### 8.2.2 Sequenziamento Sanger

CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE	RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO	RISULTATO ESPRESSO SUL RDP
Sequenza non interpretabile (es. sequenza di lunghezza ridotta, presenza di numerosi doppi picchi che determinano la presenza di nucleotidi ambigui, ecc) – riferibile a campione <b>DUBBIO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato</b> Sequenza non interpretabile
Campione non idoneo al sequenziamento (es. presenza di solo rumore di fondo, mancanza di un segnale netto di fluorescenza che identifichi le basi; picchi molto bassi lungo tutta la traccia dell'elettroferogramma) - riferibile a campione <b>INADATTO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato</b> Campione non sequenziabile
Massima similarità di sequenza con organismi diversi da paramyxovirus aviare di tipo 1 – riferibile a campione <b>NEGATIVO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato negativo:</b> Sequenza non attribuibile a virus Avian Paramyxovirus Tipo 1
Massima similarità di sequenza con paramyxovirus aviare di tipo 1 – riferibile a campione <b>POSITIVO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato positivo:</b> Sequenza attribuibile a Avian Paramyxovirus Tipo 1. La sequenza amminoacidica dedotta dal sito di clivaggio della proteina F è riferibile a ceppo velogeno.  Oppure  Sequenza attribuibile a Avian Paramyxovirus Tipo 1. La sequenza amminoacidica dedotta dal sito di clivaggio della proteina F è riferibile a ceppo lentogeno.

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 e la patotipizzazione del paramyxovirus aviario di tipo 1.

## 9. Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento a "PR 09 – Gestione dei rifiuti" e 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
00	14.11.22	Prima emissione	Dr.ssa V. Panzarin Dr. A. Fortin	Dr.ssa A. Granato Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli