

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrici + Specie	Tecnica di prova
Segmenti 4 (HA) e 6 (NA) del genoma del virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIV) codificanti rispettivamente per l'emoagglutina dei sottotipi H1-H8 e H10-H16 e per la neuraminidasi dei sottotipi N1-N9	Isolati virali, organi/tessuti, feci e tamponi da specie aviarie e di mammifero, latte di origine animale, tamponi nasali/faringei umani, RNA/DNA estratto dalle suddette matrici	One step reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR)
Scopo della prova		
<p>Analisi di sub-tipizzazione di virus dell'influenza aviaria Euroasiatici. Applicabile a campioni aviari domestici e selvatici e a campioni da mammifero, ivi compresi soggetti umani esposti ad AIV. Tuttavia, l'analisi applicata a tamponi nasali/faringei umani e latte è validata per il solo target H5.</p> <p>In caso di comprovata circolazione di virus H5 o H7 in una popolazione di animali domestici o selvatici, la prova può essere eseguita come analisi di prima istanza per il target specifico, dopo valutazione del <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u>. In queste circostanze, la metodica prevede l'uso del controllo interno esogeno unicamente per questi target.</p> <p>La prova può essere eseguita anche solo su un numero limitato di target predefiniti, sulla base della situazione epidemiologica o del sospetto.</p>		

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 1004 2024 Rev. 0

Bibliografia di riferimento:

- K.E. Hassan, A.K. Ahrens, A. Ali, M.F. El-Kady, H.M. Hafez, T.C. Mettenleiter, M. Beer, T. Harder. Improved subtyping of avian influenza viruses using an RT-qPCR-based low density array: 'Riems Influenza A Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses* 2022, 14(2):415. doi: 10.3390/v14020415
- J. James, M.J. Slomka, S.M. Reid, S.S. Thomas, S. Mahmood, A.M.P. Byrne, J. Cooper, C. Russel, B.C. Mollett, E. Agyeman-Dua, S. Essen, I.H. Brown, S.M. Brookes. Development and application of real-time PCR assays for specific detection of contemporary avian influenza virus subtypes N5, N6, N7, N8, and N9. *Avian Dis* 2018, 63(sp1):209-218. doi: 10.1637/11900-051518-Reg.1
- B. Hoffmann, D. Hoffmann, D. Henritzi, M. Beer, T.C. Harder. Riems influenza A typing array (RITA): an RT-qPCR-based low density array for subtyping avian and mammalian influenza A viruses. *Sci Rep* 2016, 6:27211. doi: 10.1038/srep27211
- B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeyer, 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* 2006, 136(1-2):200-9. 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, thirteenth edition 2024, 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 1004V

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 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 nella tabella sottostante e al paragrafo 4.1:

Prodotto	Fornitore / Specifiche	Conservazione
Oligonucleotidi target-specifici	Commerciale/per la sequenza fare riferimento al par. 4.1	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzati ≤ -18°C se risospesi Conservare al buio le sonde
AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents	Applied Biosystems™/rRT-PCR	≤ -18°C
Materiali di riferimento: RNA estratto da antigeni di influenza aviare sottotipi H1-H8, H10-H16, N1-N9	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target specifico, 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 (se previsto controllo interno per i target H5/H7)	Indical Bioscience/Controllo positivo di PCR (PTC) per il controllo interno “ ALL PDP 281 - Handbook intype IC-RNA”	≤ -18°C

4.1 Preparazione delle soluzioni

Prodotto	Modalità preparazione	Conservazione
Oligonucleotidi (primers e sonde)	Risospesare 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 alla concentrazione d'uso	≤ -18°C Conservare al buio le sonde
Pre-mix target-specifica e per internal control assay	Unire i volumi di primers 100 µM, sonde 100 µM e TE pH 8.0 di ciascuna pre-mix target specifica secondo quanto riportato in Annex I	≤ -18°C Conservare al buio

4.1.1
Composizione delle pre-mix e concentrazione finale di ciascun oligonucleotide nella Mastermix.
 Per alcuni target sono disponibili due diversi set di oligonucleotidi: (a) set raccomandato; (b) set disponibile come seconda opzione in caso di mancata rilevazione con (a).

Target	Oligonucleotide	Sequenza 5'-3'	Referenza†	µl nella pre-mix	Concentrazione nella Mastermix
H1	H1-F1	CCA TCT GTA TAG GCT AYC AT	[1]	20	0.8 µM
	H1-F2	AAA CAT YCC TTC CRT TCA ATC		20	0.8 µM
	H1-FAM1	FAM-TAC AGA CAC TGT YGA CAC DGT GCT-BHQ1		5	0.2 µM
	H1-FAM2	FAM-TTC ATT GAA GGR GGR TGG ACA GGA AT-BHQ1		5	0.2 µM
	H1-R1	GTG AGT CAC RGT YAC ATT CTT		20	0.8 µM
	H1-R2	GAG CAA GGI TCY GGT TAT G		20	0.8 µM
	TE pH 8.0			110	-
H2	H2-F	CTA AST GTR CCW GAA TGG TC	[1]	40	1.6 µM
	H2-R	GAG GTG TTT CAR TTC YTC RTA		40	1.6 µM
	H2-FAM	FAM-TGT GCT ACC CAG GYA GTT TCA ATG A-BHQ1		8	0.32 µM
	TE pH 8.0			112	-
H3	H3-F1	CCT CGR GGC TAY TTC AAR AT	[1]	15	0.6 µM
	H3-F2	AGA CTG GAT CYT RTG GAT TTC		15	0.6 µM
	H3-F3	CTG GGR CAC CAT GCA GT		15	0.6 µM
	H3-FAM1	FAM-TGC ATC TGA YCT CAT TAT YGA RCT TTT-BHQ1		4	0.16 µM
	H3-FAM2	FAM-ACR CAA AGC AAA AAG CAT GAT ATG GC-BHQ1		4	0.16 µM
	H3-FAM3	FAM-ACA GGG AAA ATA TGC ARC AAT CCY CA-BHQ1		4	0.16 µM
	H3-R1	ATT TGG RGT GAT RCA TTC AGA		15	0.6 µM
	H3-R2	CTC AAA TGC AAA TGK TGC AYC		15	0.6 µM
	H3-R3	TGT GCA GTC YCT TCC ATC		15	0.6 µM
	TE pH 8.0			98	-

H4	H4-F1	ACY CAG GGR TAC AAG GAC A	[1]	20	0.8 µM
	H4-F2	GGA CAT CAT YCT YTG GAT TTC		20	0.8 µM
	H4-FAM	FAM-TCC ATA TCA TGC TTY TTG CTY GTA GC-BHQ1		4	0.16 µM
	H4-R	CAA GCC CAC AAA AYR AAG G		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			116	-
H5	H5-HA1-F	GAT TYT AAA RGA TTG TAG YGT AGC	[1]	20	0.8 µM
	H5-FAM3-RC	FAM-CGC ACA TTG GRT TYC CRA GGA GCC-BHQ1		6	0.24 µM
	H5-HA1-R1	CTC TCY ACC ATG TAR GAC CA		15	0.6 µM
	H5-HA1-R2	CTC TCY ACT ATG TAR GAC CA		15	0.6 µM
	H5-F2	GTT CCC TAG YAY TGG CAA TCA T		20	0.8 µM
	H5-FAM2	FAM-CTG GTC TAT YYT TRT GGA TGT GCT CC-BHQ1		6	0.24 µM
	H5-R2 [§]	AAT TCT ARA TGC AAA TTC TGC AYT G		15	0.6 µM
	TE pH 8.0			103	-
H6	H6-F1	TTG GYG TGT ATC AAA TYC TTK C	[1]	20	0.8 µM
	H6-F2	TTG RCG TGT ATC AAA TAC TTG C		20	0.8 µM
	H6-FAM	FAM-AGR CTG CTC GAY ACC GTA CTA TAA A-BHQ1		10	0.4 µM
	H6-R	TTG ARC YAT TTG AAC ACA TCC A		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			110	-
H7	H7-F	CAA CTG AAA CRG TRG ARC G	[1]	45	1.8 µM
	H7-FAM	FAM-CCC AGG ATY TGC TCA ARA GGR AAA A-BHQ1		10	0.4 µM
	H7-R1	CAG GAG YCC ACA TTG ACC		15	0.6 µM
	H7-R2	CAG WAG YCC ACA TTG ACC		15	0.6 µM
	H7-R3	TTC TAG GAA TTG GTC ACA TTG		15	0.6 µM
	TE pH 8.0			100	-
H8	H8-F	CCA CCT AYA AAA TTC TCA GCA	[1]	40	1.6 µM
	H8-FAM [§]	FAM-TGC CAA GCA RAG ACT GGC CGC CA-BHQ1		4	0.16 µM
	H8-R	ARA CCT CCA GCA AYC AGG A		40	1.6 µM

	TE pH 8.0			116	-
H10	H10-F	CAA CTC AGR CAG AAT GCW GA	[1]	40	1.6 µM
	H10-FAM	FAM-TGC ATG GAG AGY ATA AGR AAC AAC AC-BHQ1		6	0.24 µM
	H10-R	CTT CYT CTC TGT AYT GTG AAT G		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			114	-
H11	H11-F	GGA CAT ATG AYC ACA ARG AAT T	[1]	40	1.6 µM
	H11-FAM	FAM-ACT GTC RAT TTA CAG CTG CAT YGC A-BHQ1		8	0.32 µM
	H11-R	ATG CAA ATG GTA CAT CTA CAT G		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			112	-
H12	H12-F	CAT CTA CAG CAG YGT YGC	[1]	40	1.6 µM
	H12-FAM	FAM-ACT GCT CAT GAT TAT TGG GGG TTT CA-BHQ1		12	0.48 µM
	H12-R	GAA AGT ACA ACG AAC ATT TCC A		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			108	-
H13	H13-F1	CTT AAG CAC AAA CTC ATC AGA A	[1]	20	0.8 µM
	H13-F2	CTG AGC ACC AAT TCA TCA GA		20	0.8 µM
	H13-FAM1	FAM-CKA ACC ACA CRG GAA CAT AYT GTT C-BHQ1		5	0.2 µM
	H13-FAM2	FAM-CAC ACI GGA ACA TWC TGT TCA ATC A-BHQ1		5	0.2 µM
	H13-R1	CTG GCA CAG GCA GGG TT		20	0.8 µM
	H13-R2	CCY ACA ATC CAT CCT TCA AA		20	0.8 µM
	TE pH 8.0			110	-
H14	H14-F	CCC AAT ATA GGA AGT AGA CC	[1]	40	1.6 µM
	H14-HEX	HEX-AAG CAT CTA CTG GAC YCT AGT AAA CC-BHQ1		6	0.24 µM
	H14-R	CTT CTT GTC ACT TYT AAG CAC		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			114	-
H15	H15-F	CAS CTT TCT CCG CTC TAA TG	[1]	40	1.6 µM
	H15-FAM	FAM-CAC TGG GAA TAC AGA GTG ATG CAC AA-BHQ1		3	0.12 µM
	H15-R	AAR CAT TCC CCT TCA CAT GA		40	1.6 µM

	TE pH 8.0			117	-
H16	H16-F	ARY TGA AGA CTG AAG ACA ATG T	[1]	40	1.6 µM
	H16-HEX	HEX-CTG GTA GGW CTC ATA CTY GCA TTT AT-BHQ1		6	0.24 µM
	H16-R	CCA CTG CTG CAT GCC CA		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			114	-
N1	N1-F	GRC CTT GYT TCT GGG TKG A	[1]	40	1.6 µM
	N1-FAM	FAM-CAA TYT GGA CYA GTG GRA GYA GCA T-BHQ1		6	0.24 µM
	N1-R [§]	ACC GTC TGG CCA AGA CCA		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			114	-
N2	N2-1367F	AGT CTG GTG GAC YTC AAA YAG	[3]	60	2.4 µM
	N2-1444.1FAM-MGB	FAM-CCA TCA GGC CAT GAG CCT-MGB		10	0.4 µM
	N2-1488R	AAT TGC GAA AGC TTA TAT AGV CAT		60	2.4 µM
	TE pH 8.0			70	-
N3	N3-F	GCA AYA GTA TAG TTA CYT TCT G	[1]	40	1.6 µM
	N3-FAM	FAM-AGA CAA TGA ACC TGG ATC GGG VAA-BHQ1		3	0.12 µM
	N3-R1	TTA CTT GGG CAT RAA CCC AAT		20	0.8 µM
	N3-R2	GTT GGM ACC RTC WGG CCA		20	0.8 µM
	TE pH 8.0			117	-
N4	N4-F1	GAC TAG YGG TAG TAG YAT TGC	[1]	20	0.8 µM
	N4-F2 [§]	AGT AGY ATT GCR TTY TGT GGT GTT		20	0.8 µM
	N4-HEX [§]	HEX-TGG TCR TGG CCY GAT GGC GCT CT-BHQ1		6	0.24 µM
	N4-R	CGA AAA ATY ACT TGT CTA TGT CAA		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			114	-
N5 (a)	N5-F1	CCT TCA GAA TGC AGR ACY TT	[1]	20	0.8 µM
	N5-F2	CAA ATA ATA CAG TAA ARG ACA GAA G		20	0.8 µM
	N5-FAM	FAM-TAA TGA GCG TRC CAT TGG GAT CCT C-BHQ1		6	0.24 µM
	N5-R	TAG CAG ACC AYC CRA CGG A		40	1.6 µM

	TE pH 8.0			114	-
N5 (b)	Mod-N5-1353F	TTC CAC TGT GTT TTG TGG KGT	[2]	15	0.6 µM
	Mod-N5-1375FAM	FAM-TCY AGT GAG GTC CCA GGA TGG TC-BHQ1		10	0.4 µM
	Mod-N5-1426R	CGA ATG GTA GAA TTG CTC CAT CA		15	0.6 µM
	TE pH 8.0			160	-
N6	Mod-N6-10F	AGG GTG AAA ATG AAT CCA AAT CA	[2]	40	1.6 µM
	Mod-N6-14F	TGA AAA TGA ATC CAA ATC ARA AGR TAA		40	1.6 µM
	Mod-N6-43FAM	FAM-TGC RTT TCA GCM ACA GGA RTR ACA CTA TC-BHQ1		10	0.4 µM
	Mod-N6-97R	AAT TCC TAT YAG CAG RCT TAC YAC		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			70	-
N7 (a)	N7-F1 [§]	GTT GAA TTA ATW AGA GGA AGR CC	[1]	20	0.8 µM
	N7-F2	AGA GGC YAA ATA YGT RTG GTG		20	0.8 µM
	N7-FAM	FAM-CCT ATG TGG RAG CCC ATT CCC AGT-BHQ1		3	0.12 µM
	N7-R	GAT YTG TGC CCC ATC RGG GA		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			117	-
N7 (b)	Mod-N7-1305F	GTT GAA TTR ATT AGA GGR AGR CC	[2]	40	1.6 µM
	IAV-N7-1383FAM [§]	FAM-AGC CCA DTC YCA GTT GGG TCY GGT TC-BHQ1		10	0.4 µM
	IAV-N7-1430R [§]	GAT YTG TGC CCC ATC RGG GA		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			110	-
N8 (a)	N8-F1 [§]	TCC ATG YTT TTG GGT TGA RAT GAT	[1]	15	0.6 µM
	N8-F2	CTG ATC TCT CTT ACA GGG TTG		15	0.6 µM
	N8-F3	TCC ATG YTT TTG GGT IGA AAY GAT		15	0.6 µM
	N8-FAM1 [§]	FAM-TCH AGY AGC TCC ATT GTR ATG TGT GGA GT-BHQ1		6	0.24 µM
	N8-FAM2	FAM-TGC CCA GTG ACA CTC CAA GAG GGG AA-BHQ1		6	0.24 µM
	N8-R1 [§]	GCT CCA TCR TGC CAY GAC CA		20	0.8 µM
	N8-R2	GTG CAT GAA CCG ACA AAT TGA G		20	0.8 µM
	TE pH 8.0				103

N8 (b)	Mod-N8-1296F	YCC CTG YTT TTG GGT CGA AAT GAT	[2]	20	0.8 µM
	Mod-N8-1354FAM	FAM-TCT AGT AGC TCC ATT GTA ATG TGT GGA GT-BHQ1		10	0.4 µM
	Mod-N8-1423R	GCT CCA TCG TGC CAT GAC CA		20	0.8 µM
	TE pH 8.0			150	-
N9 (b)	N9-F§	AGY ATA GTA TCR ATG TGT TCC AG	[1]	40	1.6 µM
	N9-FAM	FAM-TTC CTR GGA CAA TGG RAC TGG CC-BHQ1		3	0.12 µM
	N9-R	GTA CTC TAT TYT AGC CCC RTC		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			117	-
N9 (a)	IAV-N9-1363F§	AGY ATA GTA TCR ATG TGT TCC AG	[2]	40	1.6 µM
	IAV-N9-1393FAM§	FAM-TTC CTB GGA CAA TGG AAC TGG CC-BHQ1		10	0.4 µM
	Mod-N9-1439R	AAG TAC TCT ATT YTA GCC CCR TC		40	1.6 µM
	TE pH 8.0			110	-
IC-RNA*	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G	[4]	5	0.2 µM
	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2		3.7	0.15 µM
	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G		5	0.2 µM
	TE pH 8.0			186.3	-

§ Medesimo di Hoffmann et al., 2016 "RITA1"

* Internal control assay pre-mix. Validato solo per i target H5/H7

† [1] Hassan et al. (2022) "RITA2"; [2] James et al. (2018); [3] Hoffmann et al., (2016) "RITA1"; [4] Hoffmann et al., (2006)

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. Campioni di latte devono essere conservati a temperatura refrigerata se analizzati entro le 48 h, contrariamente devono essere conservati a temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$
- 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 anti-freddo
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	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**. Se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza, dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato è possibile prevedere durante la seduta di estrazione l’utilizzo del controllo interno in type IC-RNA (Indical Bioscience) per i soli target H5/H7.

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 dei sottotipi H1-H8, H10-H16 e N1-N9 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, se previsto per i target H5/H7): in type 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 in type IC-RNA (Indical Bioscience) (se previsto) e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione secondo **ALL PDP 1000**. Nota: se la conformità di NPC è già stata verificata mediante PDP VIR 018 applicata a monte della presente prova, non è necessario includerlo tra i controlli della seduta di rRT-PCR.
- **PTC per IC** (controllo positivo di amplificazione per IC-RNA, se previsto e relativamente ai target H5/H7): campione costituito da in type 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			1,25
2X RT-PCR Buffer	2X	1X	6,25
Pre-mix di oligonucleotidi target-specifici	Vedere Annex I		1
Internal control assay pre-mix (*)	Vedere Annex I		1
25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	0,5
Volume totale mix	Miscelare la mix per pochi secondi, centrifugare brevemente e distribuirli in volumi di 10µl per ciascun campione		10
Templato	Aggiungere il templato nelle rispettive provette		2,5
Volume finale			12,5

(*) aggiungere solo se previsto l'uso del controllo interno per la ricerca dei target H5/H7. Contrariamente, sostituire con egual volume di acqua per biologia molecolare nuclease-free

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 istruzioni riportate nell'istruzione “**IZS IDD 285** - Utilizzazione del dispensatore automatico CAS-1200” o “**IZS IDD 293** - Utilizzo di MYRA TM (Bio Molecular Systems)”.

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 (*)	56,5°C/20 sec	
Extension	72°C/30 sec	

(*) acquisizione della fluorescenza per i canali:

- FAM 515-530λ – target H1-H8, H10-H13, H15, N1-N3, N5-N9 (a) e (b)
- HEX 560-580λ – target H14, H16, N4
- Cy5 675-690λ – controllo interno esogeno (se previsto)

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 i diversi target, la threshold può essere impostata in modo automatico o manuale posizionandola sopra al rumore di fondo all'inizio della fase esponenziale delle curve di amplificazione (< 50 RFU circa; il valore della threshold può 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

Invio del campione al centro di referenza: I campioni analizzati presso i laboratori dell'IZSVe abilitati per i quali sono stati rilevati i target H5/H7 (vedi p. 8.2), vengono inviati ai laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche comparate (DSBIO) per la conferma diagnostica e successiva determinazione del patotipo.

Determinazione del patotipo: I campioni per i quali sono stati rilevati i target H5/H7 (vedi p. 8.2) vengono sottoposti ad ulteriori approfondimenti diagnostici per l'identificazione del patotipo (es. **PDP VIR 125, PDP VIR 126, PDP VIR 1005**) presso i laboratori del DSBIO.

Isolamento e caratterizzazione genetica: I campioni per i quali è stato rilevato un target di interesse (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.

8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

Parametro	Risultati attesi	Azione in caso di non conformità
PTC per ciascun target HA e NA	Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda target-specifica caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica): <ul style="list-style-type: none"> Ct = 27 ± 3 (per i target H5/H7) Ct ≤ 30 (per i rimanenti target) 	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 target-specifica e alla sonda per IC (se previsto) ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica)	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 per i target H5 e H7)	<ul style="list-style-type: none"> Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct ≤ 30, associato a qualsiasi risultato per H5/H7 Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per IC ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica), associato a rilevazione di H5/H7 (vedi paragrafo 8.2.2) 	In caso di mancata amplificazione o di Ct > 30 per IC associato a dubbia o mancata rilevazione per i target H5/H7, il campione viene considerato Inadatto (vedi paragrafo 8.2.2). 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 ALL PDP 1000
NPC	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda target-specifica ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica), associata a incremento regolare della fluorescenza	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può

	relativa alla sonda per IC (se previsto) caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct ≤ 30	decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi
PTC per IC (se previsto per i target H5/H7)	Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC caratterizzato da curva sigmoideale (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

8.2.1 Espressione standard dei risultati per tutti i sottotipi HA e NA

L'espressione dei risultati riguarda solamente i target analizzati nella singola seduta analitica.

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 target-specifica caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct ≤ 36	Positivo	Rilevato
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda target-specifica ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica)	Negativo	Non rilevato
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda target-specifica caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct > 36	Dubbio	Dubbio

8.2.2 Espressione dei risultati nel caso di prova eseguita come analisi di prima istanza per i target H5/H7 in presenza di IC

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"> Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda target-specifica ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica), in presenza di IC non conforme Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda target-specifica, caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct > 36, in presenza di IC non conforme 	Inadatto	<p>Inadatto</p> <p>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"</p>

Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda target-specifica caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct ≤ 36, indipendentemente dalla conformità di IC	Positivo	Rilevato
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda target-specifica ed assenza di curve di amplificazione sigmoideali (o logaritmiche), in presenza di IC conforme	Negativo	Non rilevato
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda target-specifica caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con Ct > 36, in presenza di IC conforme	Dubbio	Dubbio

Il bordo delle tabelle 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 e/o eseguire un test alternativo per la determinazione del sottotipo HA e NA di AIV.

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
00	30.10.24	Prima emissione	Dr.ssa V. Panzarin Dr.ssa M. Crimauto	Dr.ssa E. Stefani Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli