

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Porzione del segmento 4 del genoma del virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIV) corrispondente al sito di clivaggio dell'emoagglutinina del sottotipo H5	Isolati virali (tipicamente liquido allantoideo), organi/tessuti, feci, tamponi	One step reverse transcriptase PCR (RT-PCR) e sequenziamento Sanger

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 125 2022 Rev. 4

Bibliografia di riferimento:

- M.J. Slomka, V.J. Coward, J. Banks, B.Z. Löndt, I.H. Brown, J. Voermans, G. Koch, K.J. Handberg, P.H. Jørgensen, M. Cherbonnel-Pansart, V. Jestin, G. Cattoli, I. Capua, A. Ejdersund, P. Thorén, G. Czifra. Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. Avian Dis 51:227-234, 2007. doi: 10.1637/7674-063006R1.1
- OFFLU - Network of expertise on animal influenza, Influenza A Cleavage Sites version 4th January 2022. Accessibile all'indirizzo <https://www.offlu.org/wp-content/uploads/2022/01/Influenza-A-Cleavage-Sites-Final-04-01-2022.pdf>
- OIE - World Organization for Animal Health, Terrestrial Manual, Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (Version adopted in May 2021)

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR125V

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 x g
- Centrifuga con rotore per piastre da 96 pozzetti con velocità di almeno 5000 x 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 influenza aviare sottotipo H5 (se il metodo è usato come analisi di prima istanza)	Controllo positivo di processo (PPC) per il target H5/fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione/DSBIO IOP 038 - Gestione dei materiali di riferimento e ceppi virali	≤ -70°C

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen/RT-PCR	≤ -18°C
Primer senso H5-Kha1	Commerciale 5'-CCT CCA GAR TAT GCM TAY AAA ATT GTC-3'	≤ -18°C
Primer antisenso H5-Kha3	Commerciale 5'-TAC CAA CCG TCT ACC ATK CCY TG-3'	≤ -18°C
RNase Inhibitor 40U/μl	Commerciale/RT-PCR	≤ -18°C
RNA estratto da antigene di influenza aviaria sottotipo H5	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target H5/ DSBIO IOP 073 - 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)/ DSBIO IOP 091 - Utilizzo dello strumento QIAxcel	≤ -18°C
QIAxcel DNA High Resolution kit	Qiagen/Elettroforesi automatica su strumento Qiaxcel Advanced System (Qiagen)/ DSBIO IOP 091	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)/ DSBIO IOP 091	≤ -18°C

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

5. Verifiche da effettuare prima di iniziare la prova

Vedere allegato “**ALL PDP 1000** - Preparazione del campione ed estrazione degli acidi nucleici per la rilevazione con metodi molecolari dei virus dell'Influenza aviaria (AIV) e del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1)”.

6. Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Conservare il campione secondo:

- “**IZS IDD 007** - Modalità di conservazione dei campioni”;
- “**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”;
- “**DSBIO IOP 006** - Manipolazione campioni presso i Laboratori e U.O. SCS5 e SCS6” e analoghi di struttura.

Nel dettaglio:

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

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)”.

PREPARAZIONE CAMPIONE	Vedere “ ALL PDP 1000 ”.
------------------------------	---------------------------------

ESTRAZIONE ACIDO NUCLEICO	Moduli per la tracciabilità della seduta: “ DSBIO MOD 032 - Foglio di lavoro per estrazione” o analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi. Vedere “ ALL PDP 1000 ”, 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
----------------------------------	---

PREDISPOSIZIONE CONTROLLI	NPC	Controllo negativo di processo: campione negativo per H5 processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione
	PPC per H5 (se previsto)	Controllo positivo di processo (PPC) (se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza): campione costituito da antigene di influenza aviare del sottotipo H5 processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione
	NTC	Controllo negativo di amplificazione: campione privo dell'RNA target (tipicamente, acqua per biologia molecolare sterile nuclease-free) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
	PTC per H5	Controllo positivo di amplificazione per H5: campione costituito da RNA estratto da antigene di influenza aviare del sottotipo H5 in assenza di controllo interno IC-RNA (vedere “ ALL PDP 1000 ”), e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione

ANALISI	Reazione di RT-PCR	Preparazione Master Mix																																										
		<p>Moduli per la tracciabilità della seduta: “DSBIO MOD 035 - Protocollo master mix PCR, Nested PCR, One step PCR” o analogo modulo di struttura.</p> <p>Sotto cappa biologica a flusso laminare dedicata alla preparazione della mix:</p> <ul style="list-style-type: none"> Scongelare i reagenti indicati in tabella 1 (RT-PCR master mix), ad eccezione degli enzimi, miscelarli e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi In una provetta sterile tipo Eppendorf, preparare la mix di reazione 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 22,5 µl di master mix per ogni campione in piastra, strip oppure provette sterili da 0,2 ml <p>Tabella 1: Master mix per la reazione di RT-PCR</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reagente</th> <th>Concentrazione iniziale</th> <th>Concentrazione finale</th> <th>µl × 1 reazione</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RNase free water</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>14,3</td> </tr> <tr> <td>Qiagen OneStep RT-PCR Buffer</td> <td>5X</td> <td>1X</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>dNTP Mix</td> <td>10 mM</td> <td>0,4 mM</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>H5-Kha1</td> <td>50 µM</td> <td>1 µM</td> <td>0,5</td> </tr> <tr> <td>H5-Kha3</td> <td>50 µM</td> <td>1 µM</td> <td>0,5</td> </tr> <tr> <td>Rnase Inhibitor</td> <td>40 U/µl</td> <td>8 U</td> <td>0,2</td> </tr> <tr> <td>Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Volume totale master mix</td> <td>22,5</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Acidi nucleici/RNA</td> <td>2,5</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Volume finale</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sotto cappa biologica a flusso laminare dedicata alla dispensazione del campione:</p> <ul style="list-style-type: none"> Aggiungere 2,5 µl di template (campioni e controlli) Centrifugare per pochi secondi 	Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione	RNase free water	-	-	14,3	Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5	dNTP Mix	10 mM	0,4 mM	1	H5-Kha1	50 µM	1 µM	0,5	H5-Kha3	50 µM	1 µM	0,5	Rnase Inhibitor	40 U/µl	8 U	0,2	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	-	1	Volume totale master mix			22,5	Acidi nucleici/RNA			2,5	Volume finale	
Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione																																									
RNase free water	-	-	14,3																																									
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5																																									
dNTP Mix	10 mM	0,4 mM	1																																									
H5-Kha1	50 µM	1 µM	0,5																																									
H5-Kha3	50 µM	1 µM	0,5																																									
Rnase Inhibitor	40 U/µl	8 U	0,2																																									
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	-	1																																									
Volume totale master mix			22,5																																									
Acidi nucleici/RNA			2,5																																									
Volume finale			25																																									

Amplificazione																								
		<p style="text-align: center;">Tabella 2: 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>50°C/30 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Initial PCR activation</td> <td>94°C/15 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Denaturation</td> <td>94°C/30 sec</td> <td rowspan="3">40</td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>58°C/1 min</td> </tr> <tr> <td>Extension</td> <td>68°C/1 min</td> </tr> <tr> <td>Final extension</td> <td>68°C/7 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	50°C/30 min	1	Initial PCR activation	94°C/15 min	1	Denaturation	94°C/30 sec	40	Annealing	58°C/1 min	Extension	68°C/1 min	Final extension	68°C/7 min	1	Cooling	4°C	∞
Fase	Temperatura/Tempo	N. cicli																						
Reverse transcription	50°C/30 min	1																						
Initial PCR activation	94°C/15 min	1																						
Denaturation	94°C/30 sec	40																						
Annealing	58°C/1 min																							
Extension	68°C/1 min																							
Final extension	68°C/7 min	1																						
Cooling	4°C	∞																						
Elettroforesi capillare		<p>Vedere istruzione “DSBIO IOP 091 - Utilizzo dello strumento QIAxcel”. Le dimensioni attese del prodotto di amplificazione sono pari a 300-320 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 “DSBIO MOD 035” 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 allegato “ALL PDP 012 - Preparazione, corsa elettroforetica, colorazione di gel di acrilammide, di agarosio e di gel precast”.</p>																						
Sequenziamento Sanger		<p>Modulo per la tracciabilità della seduta: “IZS MOD 143 - Scheda accompagnamento campioni per analisi di sequenza”.</p> <p>Vedere allegato “ALL PDP 096 – 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 “IZS IDD 160 - Modalità di invio dei campioni per sequenziamento condivisione dei risultati”</p>																						
Analisi di sequenza		<p>Vedere allegato ALL PDP 096 per l'analisi dei cromatogrammi. L'identificazione del sottotipo H5 avviene allineando la sequenza nucleotidica ottenuta con le sequenze disponibili nel database GenBank mediante BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), adottando i seguenti parametri di analisi:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Web BLAST: Nucleotide BLAST</i> • <i>Choose Search set, Database: Standard databases</i> • <i>Program selection: Highly similar sequences (megablast)</i> <p>L'identificazione virale 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>”.</p>																						

		L'attribuzione del patotipo, si baserà sull'analisi della sequenza aminoacidica dedotta, corrispondente al sito di clivaggio dell'emoagglutinina del sottotipo H5, secondo le indicazioni riportate nel manuale OIE e nel sito OFFLU.
--	--	---

ATTIVITA' SUCCESSIVE ALL'ESITO	Tipizzazione, isolamento e sequenziamento	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 isolamento virale e tipizzazione, determinazione del patotipo virale <i>in vivo</i> , o ad ulteriore caratterizzazione genetica.
---------------------------------------	--	--

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 da 300-320 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 H5 (se previsto)	Presenza di banda specifica da 300-320 bp	Positivo	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione
Controllo negativo di PCR (NTC)	Assenza banda specifica da 300-320 bp	Negativo	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la RT-PCR
Controllo positivo di PCR (PTC) per H5	Presenza banda specifica da 300-320 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
Campione pervenuto non idoneo (es. campione in quantità insufficiente per eseguire l'analisi, ecc)	Inadatto*	Inadatto Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo "valore" di Izilab la motivazione della non idoneità del campione
Assenza di un qualsiasi prodotto di amplificazione	Negativo	Negativo

Presenza di un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese e sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR	Positivo	Positivo
Presenza di un prodotto di amplificazione di dimensioni diverse da quelle attese e non sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR	Effettuato**	Effettuato

*Il campione non viene sottoposto ad analisi

**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 DUBBIO	Effettuato	Effettuato Sequenza non interpretabile
Campione pervenuto 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 INADATTO	Effettuato	Effettuato Campione non sequenziabile
Massima similarità di sequenza con organismi diversi dal virus dell'influenza aviaria del sottotipo H5 – riferibile a campione NEGATIVO	Effettuato	Effettuato negativo Sequenza non attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H5
Massima similarità di sequenza con virus dell'influenza aviaria del sottotipo H5 – riferibile a campione POSITIVO	Effettuato	Effettuato positivo Sequenza attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H5. La sequenza aminoacidica dedotta dal sito di clivaggio dell'emogglutina (HA) è riferibile a ceppo ad alta patogenicità di influenza aviaria Oppure Effettuato positivo Sequenza attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H5. La sequenza aminoacidica dedotta dal sito di clivaggio dell'emogglutina (HA) è riferibile a ceppo a bassa patogenicità di influenza aviaria

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 virus dell'influenza aviaria del sottotipo H5.

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

9. Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento a "IZS ALL 005 IO (IZS IO 033) - Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di biologia molecolare", che costituisce parte integrante della presente procedura.

10. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
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
07	24.03.22	Revisione layout, scorporazione della fase di preparazione del campione e di estrazione nell'ALL PDP 1000, modifica dei controlli, modifica dell'espressione dei risultati	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa V. Panzarin	Dr.ssa P. Carnieletto Dr. C. De Battisti	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli