

PDP VIR 125

Rilevazione virus euroasiatici dell'influenza aviaria sottotipo H5 mediante one step reverse transcriptase PCR e sequenziamento Sanger

0. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
01	18.03.16	Revisione per cambio layout e correzione refusi	Dr.ssa I. Monne Dr. ssa A. Drago	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dr. Stefano Marangon
02	18.10.2016	Revisione per correzione refuso	Dr.ssa I. Monne	Dr. C. De Battisti	Direttore Sanitario Dr. Stefano Marangon
03	28.02.19	Revisione per inserimento metodo di estrazione e rilevazione del prodotto di amplificazione automatizzato	Dr.ssa I. Monne	Dr.ssa P. Carnieletto Dr. Terregino	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci

1. Scopo e campo di applicazione

La procedura descrive le modalità operative per effettuare la rilevazione di RNA del virus dell'Influenza Aviaria di tipo A sottotipo H5 HPAI e LPAI tramite one step reverse transcriptase PCR (RT-PCR) e sequenziamento Sanger.

Tipologia di campioni sottoposti ad analisi: specie aviarie

1. organi/tessuti
2. liquido allantoideo
3. feci
4. tamponi cloacali e tracheali

Gene target: porzione conservata della subunità HA2 del gene codificante per l'emoagglutinina del sottotipo H5

2. Documenti di riferimento

- M.J. Slomka, V.J. Coward, J. Banks, B.Z. Londt, I. H. Brown, J. Voermans, G. Koch, K. J. Handberg, P. H. Jorgensen, M. Cherbonnel-Pansart, V. Jestin, G. Cattoli, I. Capua, A. Ejdersund, P. Thoren, and G. Czifra. Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. *Avian Diseases* 51:227-234, 2007
- OIE Terrestrial Manual 2015 *Chapter 2.3.4. par. 1.1.1, Avian influenza, Assessment of pathogenicity*
- Documento OFFLU: <http://www.offlu.net/index.php?id=123> Lista dei siti di clivaggio per la determinazione della patogenicità su base molecolare
- Fascicolo di validazione del metodo VIR 125 V

3. Definizioni e acronimi utilizzati

- **AI:** Avian Influenza
- **BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*
- **CSP:** Centro Servizi alla Produzione dell'IZSVe
- **HA:** gene codificante l'emoagglutinina di superficie
- **HPAI:** *Highly Pathogenic Avian Influenza*
- **H5:** sottotipo dell'emoagglutinina del virus influenzale aviario
- **LPAI:** *Low Pathogenic Avian Influenza*

Per tutte le 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)", che è parte integrante della procedura e all'istruzione "DSBIO IOP 007 Istruzione per la preparazione delle soluzioni in uso presso i laboratori delle SCS5 e SCS6".

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 quanto descritto negli allegati "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)".

4.1 Attrezzature/strumenti/accessori

- Agitatore orbitale
- Apparecchiature per elettroforesi in gel di acrilamide e agarosio con relativo alimentatore
- Biglie d'acciaio 5 mm sterili
- Cappa biologica a flusso laminare
- Cappa chimica
- Cartucce per la preparazione dei campioni a 8 pozzetti da utilizzare con lo strumento QIASymphony (Sample Prep Cartridges 8 well, Qiagen)
- Centrifuga con RCF pari ad almeno 11000 x g
- Centrifuga per piastre da 96 pozzetti con RCF pari ad almeno 5000 x g (Thermo Scientific)
- Componenti di assemblaggio per il caricamento della piastra per il sequenziamento (base di supporto della piastra, gommino, coperchio)
- 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)
- Estrattore automatico QIASymphony (Qiagen), con relative puntali filter-tips da 200 e 1500 μl
- Film adesivi per piastre PCR

- Frigorifero tra + 2°C e + 8°C
- Micropipetta monocanale (0,5 a 1000 µl) con relativi puntali con filtro sterili (DNase/RNase free)
- Micropipetta multicanale (0,5-10 µl; 5-50 µl) con relativi puntali con filtro sterili (DNase/RNase free)
- Mortaio e pestello sterili
- Omogenizzatore TissueLyser II (Qiagen)
- Piastre da 96 pozzetti per PCR
- Pinze e forbici sterili
- Provette sterili da 0,2 ml a 15 ml
- QIAexcel ScreenGel Software
- QIAexcel Advanced per l'analisi automatica di frammenti di DNA
- Sequenziatore 3130xl Genetic Analyzer (LifeTechnologies)
- Softwares (SeqScape v2.5 o versioni successive – LifeTechnologies)
- Strip da 12 pozzetti per PCR (200 µl) da utilizzare per caricare i campioni sullo strumento QIAexcel
- Termociclatore per PCR end point (DNAEngine® Peltier Thermal Cycler, Biorad, S1000™ Thermal Cycler, Biorad; MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler, BIO RAD; GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems)
- Transilluminatore UV/Acquisitore di immagini (Gel Doc EZ Imager, BIO RAD)
- Vaschetta per colorazione gel di acrilamide
- Vetreria per la preparazione del gel di acrilamide e agarosio
- Vortex
- Dispositivi di protezione individuale (DPI) indicati al punto 4.3.

Per il corretto utilizzo e manutenzione delle apparecchiature fare riferimento ai relativi manuali d'uso e, ove previsti, ad altri documenti del sistema qualità ad es. istruzioni operative (IO e IDD), procedure di taratura (PDT), allegati (ALL).

4.2 Reagenti/soluzioni/kit diagnostici

Nome prodotto	Fornitore / Specifiche	Conservazione
Acqua ultrapura sterile per biologia molecolare	Commerciale	Temperatura ambiente o a ≤ -18°C
Agarosio per biologia molecolare	Commerciale	Temperatura ambiente
Alcol etilico denaturato al 70%	Commerciale Pulizia e disinfezione delle superfici /DSBIO IOP 007	Temperatura ambiente
Antigene di influenza aviare tipo A sottotipo H5	Controllo positivo di processo (PPC)/fornito da SCS6 U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione/DSBIO IOP 038	≤ -70°C
Buffer ATL	Qiagen Buffer per QIASymphony/DSBIO IOP 090 QIASYMPHONY	Temperatura ambiente
Etanolo 70%	Commerciale Estrazione manuale RNA /DSBIO IOP 007	Temperatura ambiente
Etanolo assoluto 96-100%	Commerciale	Temperatura ambiente
Marcatore molecolare idoneo alle dimensioni dell'amplificato atteso (300-320bp)	Commerciale/DSBIO IOP 007	Tra + 2°C e + 8°C
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel Estrazione manuale RNA (ALL PDP 023)	Temperatura ambiente ad esclusione della DNasi che si

		conserva tra + 2°C e + 8°C liofilizzata e a ≤ -18°C una volta ricostituita
One Step RT-PCR Kit	Qiagen Reverse transcriptase PCR	≤ -18°C
PBS antibiotato sterile	Centro servizi alla produzione (CSP)	Tra + 2°C e + 8°C
Polvere di quarzo	Commerciale	Temperatura ambiente
Primer antisenso H5-Kha3	Commerciale 5'-TAC CAA CCG TCT ACC ATK CCY TG-3'	≤ -18°C
Primer senso H5-Kha1	Commerciale 5'-CCT CCA GAR TAT GCM TAY AAA ATT GTC-3'	≤ -18°C
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit	Qiagen Estrazione di acidi nucleici con estrattore automatico/DSBIO IOP 090 QIASYMPHONY	Temperatura ambiente
QIAXcel DNA High Resolution kit	Qiagen Elettroforesi automatica dei frammenti di DNA include: cartuccia, wash buffer, separation buffer, olio minerale, calibration marker, DNA dilution buffer/ DSBIO IOP 091 QIAXCEL	Tra + 2°C e + 8°C e dopo l'apertura conservare a temperatura ambiente: cartuccia, wash buffer, separation buffer, olio minerale
QX Alignment Marker 15bp-3kb	Qiagen/ DSBIO IOP 091 QIAXCEL	≤ -18°C
QX Size Marker 100–2500 bp (100 ng/μl)	Qiagen/ DSBIO IOP 091 QIAXCEL	Diluito alla conc. d'uso (20 ng/μl) ≤ -18°C
Reagenti per preparazione gel di Acrilamide al 7% e agarosio al 2%	Vedi ALL PDP 012	Tra + 2°C e + 8°C
Reagenti per sequenziamento	Vedi ALL PDP 096	Temperatura ambiente/ + 2°C e + 8°C/≤ -18°C
RNase Inhibitor 40U/ μl	Promega	≤ -18°C
RNA estratto da Ceppo H5	Controllo positivo di PCR /fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione (SCS6) DSBIO IOP 073	≤ -70°C
Soluzioni per colorazione gel di Acrilamide	Vedi ALL PDP 012	Temperatura ambiente
Soluzioni per corsa elettroforetica	Vedi ALL PDP 012	Temperatura ambiente e/o tra + 2°C e + 8°C
TE pH 8 (soluzione buffer sterile)	Commerciale/-CSP	Temperatura ambiente
Disinfettante per superfici (Es. Virkon 1% o Sodio ipoclorito 0,6% o VI-Sept soluzione disinfettante)	Commerciale Pulizia e disinfezione delle superfici /DSBIO IOP 007	Temperatura ambiente

Note: i primer liofilizzati vengono ricostituiti in TE alla concentrazione di 100 μM; successivamente vengono ulteriormente diluiti in TE alla concentrazione d'uso e conservati a temperatura ≤ -18°C.

4.3 Norme di sicurezza

Accesso ai laboratori e norme di comportamento	
In laboratorio è obbligatorio l'uso di 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. Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con sapone disinfettante
Estrazione acidi nucleici	Eseguire 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 nel termociclatore, piattaforma real time e sequenziatore	Utilizzare guanti monouso
Utilizzo forno a microonde per la preparazione del gel d'agarosio	Utilizzare guanti anticalore e visiera
Preparazione e manipolazione del gel di acrilamide e agarosio	Uso della cappa chimica e guanti monouso
Caricamento del campione e corsa elettroforetica	Utilizzare guanti monouso
Rilevazione del prodotto di amplificazione mediante transilluminatore UV (gel agarosio)	Utilizzare guanti monouso e occhiali protettivi anti-UV (nel caso in cui il transilluminatore non sia chiuso in apposita camera)
Rilevazione del prodotto di amplificazione in gel di acrilamide	Utilizzare guanti monouso e cappa chimica
Per tutte le fasi di processo	Avvertenze: frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante

4.4 Modalità operative

4.4.1 Preparazione del campione ed estrazione del RNA

È possibile estrarre il RNA con due modalità diverse: manuale ed automatica.

Conservazione dei campioni

I tamponi stemperati, 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.

4.4.2 Estrazione manuale

Eseguire le successive operazioni in un'area dedicata e sotto cappa biologica a flusso laminare. Processare in funzione della tipologia del campione procedendo come di seguito descritto.

Nota: La procedura di estrazione di RNA descritta nel presente documento non utilizza il reagente β -mercaptoetanolo così come previsto nel manuale del kit di estrazione utilizzato (NucleoSpin® RNA).

Liquido allantoideo

In una provetta sterile pipettare 100 µl di liquido allantoideo e miscelarlo con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β- mercaptoetanolo). Aggiungere 300 µl di etanolo 70% e mescolare usando il vortex

Organi/tessuti (organi di elezione polmone, trachea e intestino):

a) Omogeneizzazione con pestello e mortaio:

- Utilizzando forbici e pinze sterili prelevare un volume corrispondente a circa 5x5x5 mm di tessuto in esame e deporlo in un mortaio sterile. Il range di peso del frammento di tessuto prelevato è di circa 150-200 mg (dipendentemente dal tipo di tessuto/organo);
- 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 (450-600 µl), omogeneizzare e trasferire il tutto in una provetta sterile;
- Immergere gli strumenti utilizzati in Virkon all' 1%;
- Centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità;
- In una provetta sterile pipettare 100 µl di surnatante e miscelarlo con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β-mercaptoetanolo);
- Aggiungere 300 µl di etanolo 70% e mescolare usando il vortex.

b) Omogeneizzazione con TissueLyser II:

- Prelevare un volume corrispondente a circa 5x5x5 mm (cubo di lato 5 mm) di tessuto in esame e deporlo in una provetta sterile. Il range di peso del frammento di tessuto prelevato è di circa 150-200 mg (dipendentemente dal tipo di tessuto/organo);
- Aggiungere una biglia in acciaio sterile da 5 mm;
- Aggiungere *Lysis Buffer RA1 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 Virkon all' 1%;
- Centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità;
- In una provetta sterile pipettare 100 µl di surnatante e miscelarlo con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β-mercaptoetanolo);
- Aggiungere 300 µl di etanolo 70% e mescolare usando il vortex.

*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 o Lysis buffer RA1) il rapporto deve rimanere comunque 1/3 p/v. Per l'omogeneizzazione automatica, 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
- Omogenare la sospensione mediante vortex;
- In una provetta sterile pipettare 100 µl di sospensione e miscelarlo con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β- mercaptoetanolo);

- Aggiungere 300 µl di etanolo 70% e mescolare usando il vortex.

Feci

- Diluire le feci in rapporto 1:2 in PBS antibiotato
- Risospendere le feci accuratamente usando il vortex;
- Centrifugare alla max velocità per 30 secondi;
- In una provetta sterile pipettare 100 µl di surnatante e miscelarlo con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β-mercaptoetanolo);
- Aggiungere 300 µl di etanolo 70% e mescolare usando il vortex.

4.4.2.1 Estrazione RNA manuale

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

- Per l'estrazione manuale di RNA da omogenati d'organo, feci, liquido allantoideo e tamponi (tracheali/cloacali) si utilizza il kit commerciale RNA isolation - Nucleospin® RNA (Macherey Nagel).
- Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le raccomandazioni riportate nell'allegato ALL PDP 023 "RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)"
- Proseguire in conformità alle specifiche indicate nell'allegato ALL PDP 023: seguire il protocollo 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 funge da controllo negativo di processo (NPC). Tale controllo sarà costituito da 100 µl di PBS antibiotato sterile o Lysis Buffer RA1 e miscelato con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β-mercaptoetanolo) e processato come descritto nel paragrafo "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 ≤ -70°C fino al suo utilizzo (oppure a temperatura ≤ -18°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 analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.3 Estrazione automatica sistema QIASymphony

4.4.3.1 Preparazione del campione

Eeguire le successive operazioni in un'area dedicata e sotto cappa biologica a flusso laminare. Processare in funzione della tipologia del campione procedendo come di seguito descritto.

Liquido allantoideo

In una provetta sterile pipettare 300 µl di liquido allantoideo e miscelarlo con 250 µl di Lysis Buffer ATL.

Organi/tessuti (organi di elezione polmone, trachea e intestino)

- a) Omogeneizzazione con pestello e mortaio:
 - Utilizzando forbici e pinze sterili prelevare un volume corrispondente a circa 5x5x5 mm di tessuto in esame e deporlo in un mortaio sterile. Il range di peso del frammento di tessuto prelevato è di circa 150-200 mg (dipendentemente dal tipo di tessuto/organo);

- 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 (450-600 µl), omogeneizzare e trasferire il tutto in una provetta sterile;
- Immergere gli strumenti utilizzati in Virkon all' 1%;
- Centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità;
- In un tubo da 2ml pipettare 300 µl di surnatante e miscelarlo con 250 µl di Lysis Buffer ATL.

b) Omogeneizzazione con TissueLyser II:

- Prelevare un volume corrispondente a circa 5x5x5 mm di tessuto in esame e deporlo in una provetta sterile. Il range di peso del frammento di tessuto prelevato è di circa 150-200 mg (dipendentemente dal tipo di tessuto/organo);
- Aggiungere una biglia in acciaio sterile da 5 mm;
- Aggiungere *Lysis Buffer ATL 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 Virkon all' 1%;
- Centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità;
- In un tubo da 2ml pipettare 300 µl di surnatante e miscelarlo con 250 µl di Lysis Buffer ATL.

*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 o Lysis buffer ATL) 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;
- Omogenare la sospensione mediante vortex;
- In un tubo da 2ml pipettare 300 µl di sospensione e miscelarlo con 250 µl di Lysis Buffer ATL.

Feci

- Diluire le feci in rapporto 1:2 in PBS antibiotato. Risospendere le feci accuratamente usando il vortex;
- Centrifugare alla max velocità per 30 secondi;
- In un tubo da 2ml pipettare 300 µl di surnatante e miscelarlo con 250 µl di Lysis Buffer ATL.

4.4.3.2 Estrazione RNA

Eseguire le operazioni descritte dalla DSBIO IOP 090 QIASYMPHONY che fa parte integrante di questa procedura.

L'eluato contenente RNA viene conservato a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ fino al suo utilizzo (oppure a temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ 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 analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.4 Predisposizione dei controlli/materiali di riferimento

Nella fase di amplificazione, vengono predisposti i seguenti controlli:

- **Controllo positivo di PCR (controllo di amplificazione, PTC):** RNA estratto dal ceppo di riferimento sottotipo H5 fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione (SCS6) procedendo come descritto nel paragrafo 4.4.2.1 protocollo 5.1 “RNA purification from cultured cells and tissue” del kit Nucleospin® RNA” (ALL PDP 023) da step 5 a step 9.
- **Controllo reagenti 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 negativo di processo (NPC):** come descritto nel paragrafo 4.4.2.1

4.4.5 Retrotrascrizione/amplificazione

La preparazione della miscela dei reagenti necessari alla reazione di retrotrascrizione/amplificazione è effettuata sotto cappa dedicata secondo quanto previsto dall'allegato ALL PDP 011 “Principi generali per l'esecuzione delle tecniche di prova di biologia molecolare basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)” con le specifiche riportate in tabella 1 e 2.

Preparare la miscela contenente i reagenti necessari alla reazione di RT-PCR secondo le indicazioni riportate in tabella 1):

- Scongelare i reagenti, mescolarli delicatamente e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi;
- In una provetta sterile da 1,5 ml preparare la miscela di reazione aggiungendo i reagenti nell'ordine indicato in tabella 1, 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 22,5 µl di miscela per ogni campione in provette sterili da 0,2 ml.

Tabella 1 Concentrazioni e volumi dei reagenti relativi alla reazione di RT-PCR

REAGENTE	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
RNase-free water	/	/	14,3
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5
dNTPs Mix	10 mM	0,4 mM	1
Primer senso H5-Kha1	50 µM	1 µM	0,5
Primer antisense H5-Kha3	50 µM	1 µM	0,5
RNase Inhibitor	40U/ µl	8U	0,2
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	/	/	1
VOLUME TOTALE	Vortexare la mix per pochi secondi e centrifugare brevemente, distribuirli in volumi di 22,5 µl in provette per PCR da 0,2 ml		22,5
VOLUME CAMPIONE RNA	Aggiungere RNA nelle rispettive provette		2,5
VOLUME FINALE DI REAZIONE			25

Procedere con l'allestimento dei campioni da sottoporre a One-Step RT-PCR in un'area dedicata alla manipolazione degli acidi nucleici:

- Aggiungere ad ogni provetta 2,5 µl di RNA (nel caso del controllo NTC, verranno aggiunti 2,5 µl di acqua ultrapura per biologia molecolare);

- Programmare il termociclatore secondo le condizioni di amplificazione riportate in tabella 2) utilizzando il programma preimpostato "H5 Kha" o tramite programmazione manuale;
- Disporre le provette all'interno dello strumento ed avviare il programma di amplificazione.

Tabella 2 Profilo termico di amplificazione

Fase	Temperatura /Tempo	N. cicli
RT	50°C / 30 min	1
Attivazione Taq polimerasi	94°C / 15 min	1
Denaturazione	94°C / 30 sec	40
Annealing	58/1 min	
Estensione	68°C / 1 min	
Elongazione finale	68°C / 7 min	1
Raffreddamento	4°C	

Le condizioni di PCR così come la data, il target e il numero univoco identificativo dei campioni analizzati sono riportati in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO MOD 035 Protocollo master mix pcr, nested-pcr, one-step pcr" (o analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.6 Rilevazione del prodotto di amplificazione

La rilevazione degli amplificati può essere eseguita tramite elettroforesi in gel o mediante elettroforesi automatica tramite QIAxcel System sulla base di una scelta di tipo tecnico-organizzativa.

4.4.6.1 Rilevazione del prodotto di amplificazione tramite elettroforesi su gel

Procedere alla rilevazione del prodotto di amplificazione in gel di acrilamide 7% seguendo le modalità operative previste dall'allegato ALL PDP 012 "Preparazione, corsa elettroforetica, colorazione di gel di acrilamide e di agarosio" (con le seguenti specifiche: volume amplificato 5 µl, volume gel loading buffer 1 µl, volume marker 4 µl), che costituiscono parte integrante della presente procedura. Caricare in un pozzetto del gel il marcatore molecolare idoneo al prodotto di amplificazione atteso (300-320bp).

Le condizioni di corsa, la data, il target, il numero univoco identificativo dei campioni analizzati, l'ordine di caricamento dei campioni e del marker specifico e una copia dell'immagine relativa alla corsa elettroforetica stessa, sono riportate in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO MOD 033 – gel elettroforesi (o analogo modulo di struttura)", che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.6.2 Rilevazione del prodotto di amplificazione mediante elettroforesi automatica

La rilevazione del prodotto di amplificazione mediante elettroforesi automatica con lo strumento QIAxcel Advanced viene effettuata secondo l'istruzione operativa DSBIO IOP 091 QIAXCEL.

Il target, il numero univoco identificativo dei campioni analizzati, l'ordine di caricamento dei campioni, il report e l'immagine relativa alla corsa elettroforetica stessa, generati dall'analisi informatica della corsa utilizzando QIAexcel ScreenGel Software, vengono stampati e allegati in modalità cartacea al foglio di lavoro.

Al termine di ogni singola corsa, l'esecuzione della stessa, viene registrata sul DSBIO MOD 128 con il nome dell'unità esecutrice.

4.5 Espressione dei risultati di amplificazione

Confrontare la dimensione dei prodotti di amplificazione ottenuti con quelli attesi mediante gel elettroforesi.

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

- **Controllo positivo di PCR (PTC):** presenza di una banda di 300-320 bp
- **Controllo negativo di processo (NPC):** assenza della banda sopra indicata
- **Controllo negativo reagenti di PCR (NTC):** assenza della banda sopra indicata

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:

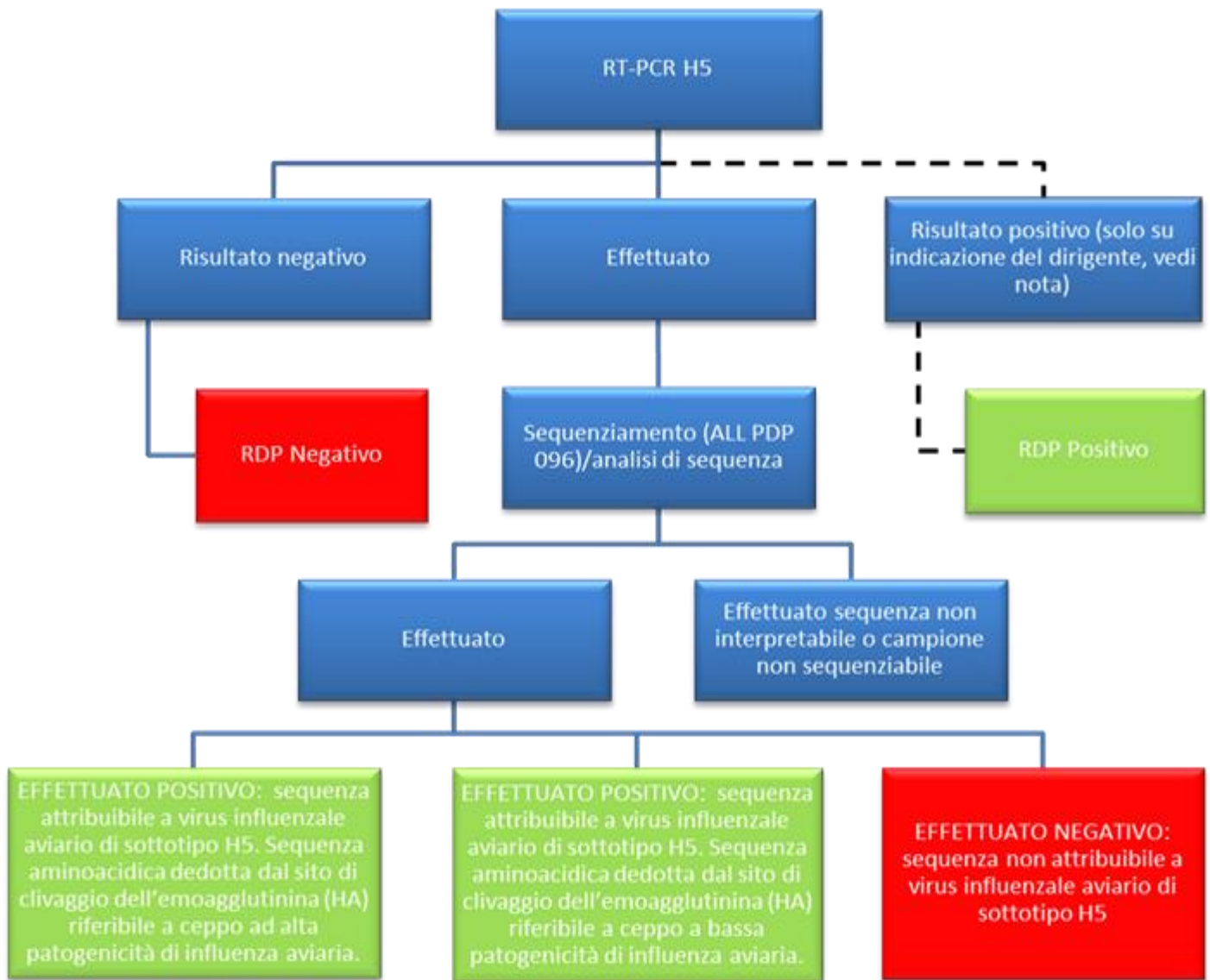
- Reazione di amplificazione se il controllo positivo di PCR è risultato non conforme;
- Reazione di amplificazione, avendo cura di sostituire tutti i reagenti, se NTC è risultato non conforme;
- Estrazione se NPC è risultato non conforme.

Il **campione** viene definito **NEGATIVO** alla RT-PCR e nel rapporto di prova il risultato viene espresso come **NEGATIVO**, dopo corsa elettroforetica, **non** si rileva un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese e sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR.

Il **campione** viene definito **EFFETTUATO** se, dopo corsa elettroforetica, si rileva un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese e sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR. Nel rapporto di prova della RT-PCR il risultato viene espresso come **EFFETTUATO** e il campione viene sottoposto a sequenziamento secondo quanto indicato al paragrafo 4.5.1. Il dirigente responsabile del laboratorio, o un suo delegato, può, tuttavia, decidere di definire il campione, nel rapporto di prova, come **POSITIVO** (se, dopo corsa elettroforetica, si rileva un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese e sovrapponibile a quello osservato nel controllo positivo di PCR) senza procedere con il sequenziamento come previsto, se si è in una o più delle seguenti condizioni:

- Positività RT-PCR da campioni provenienti da focolaio già confermato o sospetto;
- Positività RT-PCR in campioni provenienti da medesima unità epidemiologica (es. stesso allevamento) nella quale almeno un campione sia stato confermato con sequenziamento;
- Positività in RT-PCR in campioni provenienti da caso (allevamento, capannone, ecc.) epidemiologicamente correlato a focolaio confermato.

Vedi diagramma di flusso sottostante:



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

4.5.1 Sequenziamento Sanger

L'amplificato del campione definito **EFFETTUATO** alla RT-PCR, con allegata la lettera invio campioni e foto del gel, (IZS MOD 143), viene inviato refrigerato o a temperatura ambiente (secondo "IZS IDD 160 PRGA "Modalità di invio dei campioni per sequenziamento condivisione dei risultati") alla U.O. Sequenziamento genetica e Bioinformatica della SCS5 per essere sottoposto a sequenziamento secondo l'allegato "ALL PDP 096 Purificazione dei prodotti di PCR ed analisi di sequenza per uso diagnostico" parte integrante della presente procedura.

4.5.2 Analisi dei risultati di sequenziamento ed espressione dei risultati

La sequenza ottenuta a seguito della fase di sequenziamento, eseguita secondo l'allegato ALL PDP 096, viene analizzata e caratterizzata tramite il programma on line BLASTN

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome). La sequenza in esame viene confrontata con le altre sequenze presenti nel database GenBank [parametri di analisi. Tipo: nucleotide blast, Choose search set-Database: others, Program selection-Optimized for: Highly similar sequences (megablast)]. L'identificazione della sequenza incognita avverrà sulla base della similarità con la sequenza di riferimento con la quale presenta il valore massimo di "max score". I risultati riportano anche la patogenicità dedotta su base molecolare del ceppo virale sequenziato (patotipizzazione). La patotipizzazione avverrà tramite il confronto delle sequenze aminoacidiche dedotte a livello del sito di clivaggio dell'emoagglutinina in accordo con la definizione riportata nel OIE Terrestrial Manual 2015 (Chapter 2.3.4., Avian influenza) con sequenze di virus influenzali aviari a bassa o alta patogenicità (LPAI HPAI) elencate nel sito OFFLU ([website:http://www.offlu.net/index.php?id=123](http://www.offlu.net/index.php?id=123)).

In caso il BLAST confermi la massima similarità con un virus influenzale appartenente al sottotipo H5 e la patotipizzazione identificasse il virus come HPAI, il risultato verrà espresso come segue sul rapporto di prova:

- Effettuato positivo: sequenza attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H5. La sequenza aminoacidica dedotta dal sito di clivaggio dell'emoagglutinina (HA) è riferibile a ceppo ad alta patogenicità di influenza aviaria.

In caso il BLAST confermi la massima similarità con un virus influenzale appartenente al sottotipo H5 e la patotipizzazione identificasse il virus come LPAI, il risultato verrà espresso come segue sul rapporto di prova:

- Effettuato positivo: sequenza attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H5. La sequenza aminoacidica dedotta dal sito di clivaggio dell'emoagglutinina (HA) è riferibile a ceppo a bassa patogenicità di influenza aviaria.

In caso la sequenza presenti al BLAST la massima similarità con organismi diversi dal virus influenza di sottotipo H5 atteso, il risultato sarà espresso come sul rapporto di prova:

- Effettuato negativo: sequenza non attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H5.

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 si faccia riferimento a quanto dichiarato nel modulo "IZS MOD 031 - Dichiarazione di validazione/verifica delle prestazioni ed idoneità del metodo di prova" che costituisce parte integrante della presente procedura."

La documentazione relativa è allegata al fascicolo di validazione (VIR125V) conservato presso la Struttura Complessa SCS5 - Ricerca e Innovazione.

4.7 Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento al dedicato ALL 005 (IO ISZV 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 (Sez. 5.10) "Presentazione dei risultati del laboratorio di prova".

5. Documenti allegati e/o correlati

- **Manuale della Qualità MQI:** Sezione 5.10 “Presentazione dei risultati del laboratorio di prova”
- **PR 01:** Gestione Processo Analitico
- **MP GARMR:** Gestione apparecchiature, reagenti, campioni e materiali di riferimento
- **PR COMP:** 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
- **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 012:** Preparazione, corsa elettroforetica, colorazione di gel di acrilamide e di agarosio;
- **ALL PDP 023:** RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)
- **ALL PDP 096** Purificazione
- **IZS IDD 069 (PR GAC):** Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria
- **IZS IDD 160 (PR GAC):** Modalità di invio dei campioni per sequenziamento condivisione dei risultati
- **IZS MOD 143 (PR GAC):** Accompagnamento campioni per analisi di sequenza
- **IZS MOD 031 (PR SVVP):** Dichiarazione di validazione/verifica delle prestazioni ed idoneità del metodo di prova
- **DSBIO IOP 003:** Gestione archivio e documenti in uso
- **DSBIO IOP 007:** Istruzione per la preparazione delle soluzioni e dei reattivi in uso presso i laboratori delle Strutture complesse 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:** QIASymphony SP
- **DSBIO IOP 091:** Utilizzo dello strumento QIAxcel
- dei prodotti di PCR ed analisi di sequenza per uso diagnostico
- **DSBIO MOD 032:** Foglio di lavoro per estrazione
- **DSBIO MOD 033:** Gel elettroforesi
- **DSBIO MOD 035:** Protocollo master mix pcr, nested-pcr, one-step pcr
- **DSBIO MOD 128:** Scheda utilizzo cartuccia QIAxcel DNA high resolution