

## 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 H7	Isolati virali (tipicamente, liquido allantoideo), organi/tessuti, feci, tamponi, RNA/DNA estratto	One step reverse transcriptase PCR (RT-PCR) e sequenziamento Sanger

## 2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 126 2023 Rev. 04

Bibliografia 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
- OFFLU - Network of expertise on animal influenza, Influenza A Cleavage Site update. Accessibile all'indirizzo <https://www.offlu.org/wp-content/uploads/2022/01/Influenza-A-Cleavage-Sites-Final-04-01-2022.pdf>
- WOAH - 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. VIR126V

## 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 piastre da 96 pozzetti con velocità di almeno 5000 × g;
- Centrifuga con rotore per provette da 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml e 0,2 ml con velocità fino a 18000 × g;
- QIAxcel Advanced System (Qiagen) e relativi consumabili (0,2 ml 12-tube strip);
- 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.

#### 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 H7 (se il metodo è usato come analisi di prima istanza)	Fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione/Controllo positivo di processo (PPC) per il target H7	≤ -70°C
QIAGEN One Step RT-PCR Kit	Qiagen / RT-PCR	≤ -18°C
Primer senso H7-GK7.3	Commerciale 5'- ATG TCC GAG ATA TGT TAA GCA -3'	≤ -18°C
Primer antisenso H7-GK7.4	Commerciale 5'- TTT GTA ATC TGC AGC AGT TC -3'	≤ -18°C
RNase Inhibitor 40U/μl	Commerciale / RT-PCR	≤ -18°C
RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H7	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target H7 preparato da antigene fornito dalla U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione	≤ -70°C
QX DNA Alignment Marker 15bp-3 kb	Qiagen / Elettroforesi automatica su strumento Qiaxcel Advanced System (Qiagen)	≤ -18°C
QIAxcel DNA High Resolution kit	Qiagen / Elettroforesi automatica su strumento Qiaxcel Advanced System (Qiagen)	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)	≤ -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 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 termociclature 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 allegato " <b>ALL PDP 1000</b> - 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)".
------------------------------	---

<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 (e 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 H7 (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free o PBS antibiotato) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione (vedere <b>ALL PDP 1000</b> )
	<b>PPC per H7 (se previsto)</b>	Controllo positivo di processo (se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza): campione costituito da antigene di influenza aviaria del sottotipo H7 processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione (vedere <b>ALL PDP 1000</b> )

	<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 H7</b>	Controllo positivo di amplificazione per H7: campione costituito da RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H7 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

<b>ANALISI</b>	<b>Reazione di RT-PCR</b>	<p><b>Preparazione Master Mix</b></p> <p>Moduli per la tracciabilità della seduta: <b>“DSBIO MOD 035 - Protocollo master mix PCR, Nested PCR, One step PCR”</b> 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"> <li>• Scongellare i reagenti indicati in tabella 1, ad eccezione degli enzimi, miscelarli e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi;</li> <li>• 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);</li> <li>• Miscelare la mix di reazione mediante vortex e centrifugare per pochi secondi;</li> <li>• Aliquotare 22,5 µl di master mix per ogni campione in piastra, strip oppure provette sterili da 0,2 ml.</li> </ul>
----------------	---------------------------	--

**Tabella 1:** Preparazione della mix di reazione per RT- PCR

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione
RNase-free water	-	-	14,3
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5
dNTPs Mix	10 mM	0,4 mM	1
H7-GK 7.3	50 µM	1 µM	0,5
H7-GK 7.4	50 µM	1 µM	0,5
RNase Inhibitor	40U/ µl	8U	0,2
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	-	1
Volume totale master mix			22,5
Acidi nucleici/RNA			2,5
Volume finale			25

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

- Aggiungere 2,5 µl di template (campioni e controlli)
- Centrifugare per pochi secondi

#### Amplificazione

**Tabella 2:** Profilo termico di amplificazione

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	52°C/45 sec	
Extension	68°C/1 min	
Final extension	68°C/7 min	1
Cooling	4°C	∞

#### Elettroforesi capillare

Vedere istruzione "DSBIO IOP 091 - Utilizzo dello strumento QIAxcel". Le dimensioni attese del prodotto di amplificazione sono pari a 200-220 bp.

		<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 <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".</p>
	<p><b>Sequenziamento Sanger</b></p>	<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>
	<p><b>Analisi di sequenza</b></p>	<p>Vedere allegato <b>ALL PDP 096</b> per l'analisi dei cromatogrammi mediante software SeqScope.</p> <p>L'identificazione del sottotipo H7 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 del sottotipo H7 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 output dell'analisi BLAST).</p> <p>L'attribuzione del patotipo, si baserà sull'analisi della sequenza aminoacidica dedotta, corrispondente al sito di clivaggio dell'emoagglutinina del sottotipo H7, secondo le indicazioni riportate nel manuale WOH (ex OIE) e nel sito OFFLU.</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 isolamento virale e tipizzazione, determinazione del patotipo virale <i>in vivo</i>, o ad ulteriore caratterizzazione genetica (es. <b>PDP VIR 005</b>).</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	Azione in caso NC
Controllo negativo di processo (NPC)	Assenza di banda specifica da 200-220 bp	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici
Controllo positivo di processo (PPC) per H7 (se previsto)	Presenza di banda specifica da 200-220 bp	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione
Controllo negativo di PCR (NTC)	Assenza banda specifica da 200-220 bp	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la RT-PCR
Controllo positivo di PCR (PTC) per H7	Presenza banda specifica da 200-220 bp	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC

## 8.2 Espressione dei risultati

### 8.2.1 RT-PCR

I risultati vengono espressi e riportati nel rapporto di prova con le seguenti modalità:

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 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 <b>INADATTO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato</b> Campione non sequenziabile
Massima similarità di sequenza con organismi diversi dal virus dell'influenza aviaria del sottotipo H7 – riferibile a campione <b>NEGATIVO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato negativo</b> Sequenza non attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H7
Massima similarità di sequenza con virus dell'influenza aviaria del sottotipo H7 – riferibile a campione <b>POSITIVO</b>	<b>Effettuato</b>	<b>Effettuato positivo</b> Sequenza attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H7. La sequenza aminoacidica dedotta dal sito di clivaggio dell'emogglutina (HA) è riferibile a ceppo ad alta patogenicità di influenza aviaria  Oppure  <b>Effettuato positivo</b> Sequenza attribuibile a virus influenzale aviario di sottotipo H7. 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 H7.

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 "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
02	18.10.16	Revisione per correzione refusi	Dr.ssa I. Monne	Dr. C. De Battisti	Direttore Sanitario Dr. S. Marangon
03	27.02.19	Revisione per inserimento metodo di estrazione e rilevazione del prodotto di amplificazione automatizzato	Dr.ssa I. Monne	Dr.ssa P. Carnieletto Dr. C. Terregino	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci
04	22.03.23	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. A. Fortin	Dr. C. De Battisti Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli