

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrici	Tecnica di prova
Porzione del segmento 4 del genoma del virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIV) codificante per la subunità HA2 dell'emoagglutinina del sottotipo H5	Isolati virali (tipicamente liquido allantoideo), organi/tessuti, feci, tamponi	Onestep reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR).

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 143 2022 Rev. 3

Bibliografia di riferimento:

- M.J. Slomka, T. Pavlidis, J. Banks, W. Shell, A. McNally, S. Essen, I.H. Brown. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. Avian Dis 51(1 Suppl):373-7, 2007. doi: 10.1637/7664-060906R1.1
- 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 136(1-2):200-9, 2006. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020
- 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. VIR143V

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:

- Campionatore robotizzato per dispensazione reagenti di PCR (sistema liquid handling) Cas 1200 (Qiagen) (opzionale) e relativi puntali con filtro sterili
- 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
- Piattaforma per real time PCR CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad) e relativi consumabili
- Piattaforma per real time PCR Rotor Gene Q (Qiagen), Rotor Gene 6000 (Corbett, Australia) e relativi consumabili

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
intype IC-RNA (se previsto controllo interno)	Indical Bioscience/Controllo positivo di PCR (PTC) per il controllo interno/ “ ALL PDP 281 - Handbook intype IC-RNA”	≤ -18°C

MgCl ₂ 25 mM	Commerciale/rRT-PCR	≤ -18°C
Primer antisenso H5RH1	Commerciale/ 5'-AGACCAGCTAYCATGATTGC- 3'	≤ -18°C
Primer antisenso IC-2R (se previsto controllo interno)	Commerciale 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG- 3'	≤ -18°C
Primer senso H5LH1	Commerciale/ 5'- ACATATGACTACCCACARTATT CAG-3'	≤ -18°C
Primer senso IC-11F (se previsto controllo interno)	Commerciale 5'- CAGCCACAACGTCTATATCATG -3'	≤ -18°C
QIAGEN OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen/rRT-PCR	≤ -18°C
RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H5	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target H5/ "DSBIO IOP 073 - Gestione dei materiali di riferimento per biologia molecolare"	≤ -70°C
RNase Inhibitor 40U/μl	Commerciale/rRT-PCR	≤ -18°C
Sonda H5PRO	Commerciale/ FAM-5'- TCWACAGTGGCGAGTTCCCTA GCA-3'-TAMRA/BHQ/BBQ1	≤ -18°C
Sonda IC (se previsto controllo interno)	Commerciale CY5-5'- AGCACCCAGTCCGCCCTGAGC A-3'-BHQ2	≤ -18°C

Nota: i primer e le sonde 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, 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 $\leq -70^{\circ}\text{C}$
- 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 antirefresco
Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici	Utilizzare guanti monouso
Preparazione e avvio dell'apparecchiatura robotizzata per dispensazione reagenti di PCR	Lo strumento può essere utilizzato solo da personale addestrato. 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	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 "SVR MOD 015 - Modulo estrazione di acidi nucleici", o analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi. Vedere "ALL PDP 1000". Prevedere l'utilizzo del controllo interno in type IC-RNA (Indical Bioscience) se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza, dopo valutazione del <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato.</u>
----------------------------------	--

PREDISPOSIZIONE CONTROLLI	NPC	Controllo negativo di processo: campione negativo per H5 (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free o PBS antibiotato) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione, in presenza di IC-RNA (se previsto controllo interno)
	NTC	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
	PTC per H5	Controllo positivo di amplificazione per H5: campione costituito da RNA estratto da antigene di influenza aviaria del sottotipo H5 in assenza di

		IC-RNA (vedere ALL PDP 1000), e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
	PTC per IC-RNA	Controllo positivo di amplificazione per IC-RNA (se previsto controllo interno): campione costituito da intype IC-RNA (Indical Bioscience) diluito 1:100 in acqua per biologia molecolare nucleas-free, e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione

ANALISI	Reazione di rRT-PCR	Preparazione Master Mix																						
		<p>Moduli per la tracciabilità della seduta: “DSBIO MOD 037 - Protocollo master mix real time PCR” o “SVR MOD 032 - Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time” 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 (se previsto controllo interno) e tabella 2, ad eccezione degli enzimi, miscelarli e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi • In una provetta sterile tipo Eppendorf, preparare la miscela “Internal control assay pre-mix” secondo le indicazioni riportate in tabella 1, se previsto controllo interno. I volumi indicati sono sufficienti per circa 100 reazioni <p>Tabella 1: Internal control assay pre-mix</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reagente</th> <th>Concentrazione iniziale</th> <th>Concentrazione finale</th> <th>Volume (µl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TE pH 8.0</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>186,25</td> </tr> <tr> <td>Primer IC-11F</td> <td>100 µM</td> <td>2,5 µM</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Primer IC-2R</td> <td>100 µM</td> <td>2,5 µM</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Sonda IC</td> <td>100 µM</td> <td>1,875 µM</td> <td>3,75</td> </tr> <tr> <td>Totale</td> <td></td> <td></td> <td>200</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> • In una provetta sterile tipo Eppendorf, preparare la miscela “Master mix per la reazione di rRT-PCR” aggiungendo i reagenti nell'ordine indicato in tabella 2, ad eccezione dell'RNA; 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 23 µl di master mix per ogni campione in piastra, strip oppure provette ottiche sterili da 0,2 o da 0,1 ml <p>In alternativa a quanto sopra descritto è possibile preparare la master mix con il campionatore robotizzato per dispensazione reagenti di PCR (sistema di liquid handling tipo Cas 1200), seguendo le indicazioni riportate nell'istruzione operativa “SVR IOP 14 - Utilizzazione del</p>	Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (µl)	TE pH 8.0	-	-	186,25	Primer IC-11F	100 µM	2,5 µM	5	Primer IC-2R	100 µM	2,5 µM	5	Sonda IC	100 µM	1,875 µM	3,75	Totale	
Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume (µl)																					
TE pH 8.0	-	-	186,25																					
Primer IC-11F	100 µM	2,5 µM	5																					
Primer IC-2R	100 µM	2,5 µM	5																					
Sonda IC	100 µM	1,875 µM	3,75																					
Totale			200																					

dispensatore automatico CAS 1200", o in analoghi documenti di struttura.

Tabella 2: Master mix per la reazione di rRT-PCR

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione
RNase-free water	-	-	11
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5
dNTP Mix	10 mM	0,4 mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,25 mM	1,25
H5LH1	50 µM	0,4 µM	0,2
H5RH1	50 µM	0,4 µM	0,2
H5PRO	6 µM	0,3 µM	1,25
Internal control assay pre-mix*	-	-	2
RNase Inhibitor	40 U/µl	4 U	0,1
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	-	-	1
Volume totale master mix			23
Acidi nucleici/RNA			2
Volume finale			25

*se non è previsto l'uso del controllo interno, sostituire con un egual volume di acqua per biologia molecolare nuclease-free

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

- Aggiungere ad ogni provetta 2 µl di templato (campioni e controlli)
- Centrifugare per pochi secondi

Amplificazione

Tabella 3: Profilo termico di amplificazione

Fase	Temperatura/Tempo	N. cicli
Reverse transcription	50°C/30 min	1
Initial PCR activation	95°C/15 min	1
Denaturation	95°C/10 sec	40
Annealing*	54°C/30 sec	
Extension	72°C/10 sec	

		<p>*Acquisizione della fluorescenza nei canali green (FAM) e red (Cy5) (se previsto controllo interno).</p> <p>Nel caso di strumento CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad) in modalità <i>stand-alone</i> impostare la lettura della fluorescenza su <i>all channels</i>.</p>
	Analisi dei risultati	<p>Moduli per la tracciabilità della seduta: “DSBIO MOD 037” o “SVR MOD 032” o analogo modulo di struttura.</p> <p>Nel caso di strumento Rotor Gene 6000/RotorGene Q: al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati dal Rotor Gene 6000/RotorGene Q series software (ex Corbett, ora Qiagen). Nella finestra di analisi <i>Quantitation</i>, selezionare le opzioni <i>Dynamic tube</i> e <i>Slope Correct</i>. Per tutti i target, eliminare eventuali segnali aspecifici di fluorescenza mediante l'opzione <i>outlier removal</i> (valore pari a 5-10%) ed impostare la <i>threshold</i> ad un valore di 0,01.</p> <p>Nel caso di strumento CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad) i dati vengono elaborati dal CFX manager software Bio-Rad o dal CFX maestro software Bio-Rad: per entrambi i target, impostare la threshold manualmente sopra al rumore di fondo, posizionandola all'inizio della fase esponenziale delle curve di amplificazione (H5, tipicamente pari a circa 100 RFU e IC, tipicamente pari a circa 50 RFU).</p>

ATTIVITA' SUCCESSIVE ALL'ESITO	Tipizzazione, isolamento e sequenziamento	<p>I campioni che risultano POSITIVI (vedi p. 8.2), dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato vengono sottoposti ad ulteriori approfondimenti diagnostici per l'identificazione del patotipo (es. PDP VIR 125) presso il Centro di Referenza Nazionale ed Europeo per AI e ND con sede a Legnaro (PD).</p> <p>I campioni POSITIVI possono essere sottoposti anche ad isolamento virale e tipizzazione, determinazione del patotipo virale <i>in vivo</i>, o ad ulteriore caratterizzazione genetica (es. PDP VIR 005).</p>
---------------------------------------	--	---

8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

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

Parametro	Risultati attesi	Limite/Criteri di accettabilità	Azione in caso NC
Controllo interno (IC) (se previsto)	Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo Cy5 associato alla sonda IC, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica), in tutti i campioni	Ct ≤ 30 In caso di IC con Ct > 30 o negativo, associato ad un risultato positivo per H5, il campione viene considerato conforme e non sono necessarie ulteriori azioni	In caso di IC con Ct > 30 o negativo, associato ad un risultato negativo o dubbio per H5, diluire gli acidi nucleici estratti 1:10 con acqua per biologia molecolare nuclease-free e ripetere l'analisi a partire dalla fase di amplificazione. In caso di controllo interno nuovamente non

			conforme, ripetere l'analisi a partire dalla fase di estrazione degli acidi nucleici secondo le indicazioni riportate in ALL PDP 1000
Controllo negativo di processo (NPC)	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del fluoroforo FAM associato alla sonda H5PRO ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica). Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo Cy5 associato alla sonda IC (se previsto controllo interno), caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica)	Ct ≤ 30 (se previsto controllo interno)	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici
Controllo negativo di PCR (NTC)	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza dei fluorofori FAM e Cy5 associati alle sonde H5PRO e IC (se previsto controllo interno), ed assenza di curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche)	Negativo	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la rRT-PCR
Controllo positivo di PCR (PTC) per H5	Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo FAM associato alla sonda H5PRO, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica)	Ct ≤ 20	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC
Controllo positivo di PCR (PTC) per IC (se previsto controllo interno)	Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo Cy5 associato alla sonda IC, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica)	Ct ≤ 30	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di intype IC-RNA

8.2 Espressione dei risultati

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
In caso di applicazione della metodica come analisi di prima istanza, ove previsto controllo interno : Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del fluoroforo FAM associato alla sonda H5PRO ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), in presenza di IC non conforme	Inadatto	Inadatto Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo "valore" di Izilab la motivazione della non idoneità del campione

Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo FAM associato alla sonda H5PRO, caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con un valore di Ct > 35, in presenza di IC conforme (se previsto controllo interno)	Dubbio	Dubbio Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo "valore" e "note esterne" di Izilab eventuali commenti o raccomandazioni
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del fluoroforo FAM associato alla sonda H5PRO, ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica), in presenza di IC conforme (se previsto controllo interno)	Negativo	Negativo
Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo FAM associato alla sonda H5PRO, caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica) con un valore di Ct ≤ 35, indipendentemente dalla conformità di IC (se previsto controllo interno)	Positivo	Positivo

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 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 "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
01	18.03.16	Revisione per inserimento sensibilità diagnostica; recepimento metodo Centro di referenza comunitario	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa A. Drago	Dr.ssa Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dott. S Marangon
02	28.02.19	Revisione per inserimento metodo di estrazione automatizzato	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa Carnieletto Dr. Terregino	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci
03	06.06.22	Revisione layout, scorporazione della fase di preparazione del campione e di estrazione nell'ALL PDP 1000, inserimento del controllo interno e piattaforma per real time PCR CFX 96	Dr.ssa V. Panzarin Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli