

PDP VIR 144

Rilevazione virus euroasiatici dell'Influenza Aviaria Sottotipo H7 mediante reverse transcriptase Real Time PCR

0. Matrice delle revisioni

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
00	17.12.15	Prima emissione	Dr. G. Cattoli Dr.ssa A. Drago	Dr.ssa Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dott. S Marangon
01	18.03.16	Revisione per inserimento specificità diagnostica; recepimento metodo del 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. Terregino Dr.ssa Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci

1. Scopo e campo di applicazione

La procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per la rilevazione di RNA dei virus euroasiatici dell'Influenza Aviaria sottotipo H7 mediante one step reverse transcriptase Real Time PCR (rRT-PCR) in campioni derivanti da specie aviare.

Tipologia di campioni sottoposti ad analisi:

- liquido allantoideo
- organi/tessuti
- feci
- tamponi cloacali
- tamponi tracheali

Target: porzione conservata della subunità HA2 del gene codificante per l'emoagglutinina del sottotipo H7.

2. Documenti di riferimento

- Spackman, E., Senne, D.A, Myers, T.J, Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L, 2002. Development of a real time reverse transcriptase PCR for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutination subtypes. J. Clin.Microbiol. 40: 3256-3260
- Slomka, M.J, Coward, V.J., Banks, J., Löndt, B.Z., Brown, I.H, Voermans, J., Koch, G., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., Cherbonnel-Pansart, M., Jestin, V., Cattoli, G., Capua, I., Ejdersund, A., Thorén, P., Czifra, G., 2007b. Identification of sensitive and specific avian influenza PCR methods through blind ring trials in the European Union. Avian Dis. 51, 227-234
- Eurasian H7 avian influenza Real Time PCR “OIE/FAO international reference laboratory for AI”, ad esclusione della fase di patotipizzazione
- Fascicolo di validazione del metodo VIR144V

3. Definizioni e acronimi utilizzati

- **AI:** Avian Influenza
- **CSP:** Centro servizi alla produzione dell'IZSVe
- **H7:** Sottotipo dell'emoagglutinina del virus influenzale aviario

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)”, e che è parte integrante della procedura.

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 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

- Biglie d'acciaio 5 mm sterili
- Bilancia con risoluzione 1 mg
- Campionatore robotizzato per dispensazione reagenti di PCR (sistema liquid handling) Cas 1200 (Qiagen) (opzionale) e relativi puntali con filtro sterili
- Cappa biologica a flusso laminare
- Centrifuga con rotore per provette da 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml e 0,2 ml, 15 ml con RCF 11000xg
- Congelatore ≤ -18°C
- Congelatore ≤ -70°C

- Coperchi per 8 barre da utilizzare con lo strumento QIASymphony (8-Rod Covers, Qiagen)
- Estrattore automatico King Fisher Flex (Thermo scientific) (opzionale) con relativo materiale plastico
- 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 (da 0.5 a 1000 µl) con relativi puntali sterili (DNase/ RNase free)
- Micropipette multicanale da 0,5 a 300 µl con relativi puntali sterili (DNase/RNase free)
- Mortaio e pestello sterili
- Omogenizzatore TissueLyser II (Qiagen)
- Pinze e forbici sterili
- Pipetta da 5 ml
- Pipettatore automatico
- Provette sterili da 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 15 ml
- Provette trasparenti sterili da 0,2 ml per PCR
- Sistema liquid handling (Microlab Starlet Hamilton) (opzionale) con relativi puntali con filtro sterili
- Strumento real time PCR Rotor Gene Q (Qiagen), Rotor Gene 6000 (CORBETT, AUSTRALIA)
- Vaschette porta reagenti
- Vaschette reagenti per estrattore automatico "Reagent Container 50 ml Microlab Star-Series" (Hamilton) (opzionale)
- 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
Antigene di Influenza Aviaria sottotipo H7	Fornito da SCS6 U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione /DSBIO IOP 038	≤ -70°C
Antigene di influenza aviare tipo A (non sottotipo H5-H7-H9)	Fornito da SCS6 U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione Controllo positivo di processo (PPC)/ /DSBIO IOP 038	≤ -70°C
Buffer ATL	Qiagen Buffer per QIASymphony/DSBIO IOP 090 QIASymphony SP	Temperatura ambiente
Etanolo 70%	Commerciale Estrazione manuale RNA /DSBIO IOP 007/SVRIO19	Temperatura ambiente
Etanolo assoluto 96-100%	Commerciale	Temperatura ambiente
MgCl ₂ 25 mM (AmpliAq Gold with Gene Amp Twelve Paq 10X PCR Buffer II)	Applied Biosystems/ rRT-PCR	≤ -18°C

MagMax™ 96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit	Applied Biosystems®//estrazione RNA automatica (opzionale) ALL PDP 022	Temperatura ambiente ad esclusione dell'RNA Binding Beads che si conserva tra + 2°C e + 8°C e del Carrier RNA che si conserva ≤ -18°C fino al suo utilizzo
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
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen rRT-PCR	≤ -18°C
PBS antibiotato sterile	Centro servizi alla produzione (CSP)	Tra + 2°C e + 8°C
Polvere di quarzo	Commerciale	Temperatura ambiente
Primer senso LH6H7	Commerciale 5'-GGCCAGTATTAGAAACAACACCTATGA-3'	≤ -18°C
Primer antisenso RH4H7	Commerciale 5'-GCCCCGAAGCTAAACCAAAGTAT-3'	≤ -18°C
QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit	Qiagen Estrazione di acidi nucleici con estrattore automatico/DSBIO IOP 090 QIASymphony SP	Temperatura ambiente
RNase Inhibitor 40U/μl	Promega	≤ -18°C
RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H7	Controllo positivo di PCR (PTC) prodotto in laboratorio /DSBIO IOP 073	≤ -70°C
Sonda AI H7pro11	Commerciale FAM-5'- CCGCTGCTTAGTTTGACTGGGTCAATCT- BHQ-3'	≤ -18°C
TE pH 8 (soluzione buffer sterile)	Centro servizi alla produzione (CSP) o commerciale	Temperatura ambiente
Disinfettante per superfici (Es. Virkon 1% Sodio ipoclorito 0,6% o VI-Sept soluzione disinfettante)	Commerciale/ Pulizia e disinfezione delle superfici/ DSBIO IOP 007/SVR IOP 020	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 (50 μM) e conservati a temperatura ≤ -18°C. Le sonde liofilizzate vengono ricostituite in TE in base alla concentrazione d'uso 6 μM.

4.3 Norme di sicurezza

ACCESSO AI LABORATORI E NORME DI COMPORTAMENTO	
In laboratorio è obbligatorio l'uso di appositi DPI quali 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 biologica.
Estrazione acidi nucleici	Eseguire tutte le operazioni sotto cappa a flusso laminare, utilizzare guanti monouso e se necessario la mascherina
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.
Utilizzo piattaforma real time/ Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici/ Preparazione e posizionamento campioni nella piattaforma real time	Utilizzare guanti monouso
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, quest'ultima eseguibile con tre diversi estrattori (la tracciabilità dello strumento utilizzato in ciascuna seduta è garantita dalle informazioni riportate sul modulo estrazioni).

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.

In funzione della tipologia di campione diagnostico pervenuta, procedere come di seguito descritto.

Nota: La procedura di estrazione di RNA descritta nel presente documento non utilizza il reagente β -mercaptoetanololo, così come previsto nel manuale del kit di estrazione utilizzato (NucleoSpin® RNA), poiché è stata validata l'equivalenza del protocollo di estrazione senza il suo utilizzo.

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 -mercaptoetanololo). 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 frammento di tessuto in esame di circa 5x5x5 mm deporlo in un mortaio sterile;
- Aggiungere una piccola quantità di polvere di quarzo e sminuzzare il materiale organico con il pestello;
- Aggiungere (*) di 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:

- Utilizzando forbici e pinze sterili prelevare un frammento di tessuto in esame di circa 5x5x5 mm e deporlo in una provetta sterile;
- Aggiungere una biglia in acciaio;
- Aggiungere (*) di 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;
- 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 o Lysis buffer RA1) il rapporto deve rimanere comunque 1/3 p/v come successivamente indicato. Per l'omogeneizzazione automatica con TissueLyser II, 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

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

- Per l'estrazione 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 RNA isolation User manual paragrafo 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 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 SVR MOD 015 estrazione acidi nucleici) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.3 Estrazione automatica

4.4.3.1 Estrazione automatica sistema QIASymphony

4.4.3.1.1 Preparazione del campione

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.

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.

4.4.3.1.2 Estrazione RNA

Eeguire le operazioni descritte dalla DSBIO IOP 090 QIASymphony SP 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" (SVR MOD 015 estrazione acidi nucleici o analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.3.2 Estrazione automatica RNA con sistema *liquid handling* Microlab Starlet e/o King fisher Flex (solo per tamponi)

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

Per l'estrazione di RNA da tamponi (tracheali/cloacali) con strumenti Microlab Starlet e/o King Fisher si utilizza il kit commerciale MagMax™ 96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion).

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le raccomandazioni riportate nell'allegato "ALL PDP 022 RNA - MagMax™ 96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit handbook (Ambion)".

4.4.3.2.1 Preparazione del campione

- 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;

4.4.3.2.2 Estrazione con sistema *liquid handling* Microlab Starlet

L'estrazione automatica con sistema *liquid handling* può essere eseguita seguendo due modalità operative alternative.

Modalità 1:

- Allestire il piano di lavoro dell'estrattore secondo le indicazioni riportate nella istruzione "DSBIO IOP 079 - Utilizzo estrattore automatico Microlab Starlet Hamilton" o analogo di struttura.
- Preparare la piastra da processare (processing plate: fornita dal kit) sotto cappa biologica, distribuendo 50 µl di stemperato di tampone per pozzetto secondo lo schema cartaceo prodotto dal software "VisionMate 96-SR" dopo lettura della piastra matrix con scanner "VisionMate SR", oppure utilizzare lo schema di caricamento piastre presente nel modulo DSBIO MOD 032.

Modalità 2:

- Allestire la piastra da analizzare (processing plate: fornita dal kit) sotto cappa biologica, distribuendo 101 µl di viral lysis/binding solution, 20 µl di Bead resuspension Mix per ogni campione da analizzare seguendo le specifiche riportate nell'allegato "ALL PDP 022 RNA: MagMax™ 96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit handbook (Ambion)" che costituisce parte integrante della procedura.
- Aggiungere 50 µl di stemperato di tampone per pozzetto seguendo la disposizione dei campioni riportata nel modulo "SVR MOD 015 - Estrazione acidi nucleici" o analogo di struttura. Alloggiare la piastra nello Shaker dello strumento Microlab Starlet Hamilton e avviare lo strumento secondo quanto riportato nella istruzione "DSBIO IOP 079 - Utilizzo estrattore automatico Microlab Starlet Hamilton" o altra analoga istruzione di struttura "SVR IOP 022 Utilizzazione estrattore Hamilton".

4.4.3.2.3 Estrazione automatica sistema King Fisher Flex (solo per tamponi)

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

Allestire, come specificato di seguito, le piastre necessarie per la procedura seguendo la disposizione dei campioni riportata nel modulo "SVR MOD 015 - Estrazione acidi nucleici" o analogo di struttura:

- Piastra di lysis: distribuire 101 µl di Viral lysis/binding solution, 20 µl di Bead resuspension e 50 µl di stemperato di tampone per pozzetto
- Piastra di lavaggio: distribuire per ogni campione in due piastre, 100 µl di Wash Solution 1 e in altre due 100 µl di Wash Solution 2
- Piastra di eluzione: distribuire per ogni campione 50 µl di Elution Buffer

Posizionare le piastre nei specifici alloggiamenti dello strumento seguendo le istruzioni del display.

Durante la fase di estrazione con sistema *liquid handling* Microlab Starlet e/o King fisher Flex allestire, insieme ai campioni in analisi, un campione che funge da positivo di processo (PPC) e un campione che funge da negativo di processo (NPC) (vedi punto 4.4.4).

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).

4.4.4 Predisposizione dei controlli/materiali di riferimento

Nella fase di amplificazione, vengono predisposti i seguenti controlli:

- **Controllo positivo di processo (PPC) (solo per estrazione automatica Microlab Starlet e/o King Fisher):** costituito da 50 μl di sospensione virale di ceppo di influenza aviaria tipo A tal quale o diluito (non utilizzare i sottotipi H5-H7-H9), posizionato nella parte finale della piastra (pozzetti H10 o H11 o H12) oppure qualora la piastra non fosse completa, posizionato alla fine dei campioni in analisi.
- **Controllo negativo di processo (NPC):** per l'estrazione manuale vedi paragrafo 4.4.2.1 "Estrazione RNA manuale", per l'estrazione automatica il NPC costituito da 50 μl di pbs antibiotato posizionato dopo il PPC nella parte finale della piastra (pozzetti H10 o H11 o H12) oppure qualora la piastra non fosse completa, posizionato alla fine dei campioni in analisi
- **Controllo positivo di PCR (controllo di amplificazione, PTC):** RNA estratto da un antigene di influenza aviaria sottotipo H7 fornito dalla SCS6 procedendo come descritto nel paragrafo 4.4.2.1 "Estrazione RNA manuale" seguendo il protocollo descritto nel paragrafo "RNA purification from cultured cells and tissue" (ALL PDP 023).
- **Controllo negativo 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.

4.4.5 Reazione di retrotrascrizione-amplificazione

La preparazione della miscela dei reagenti necessari alla reazione di retrotrascrizione-amplificazione è effettuata in una 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 di reazione contenente i reagenti necessari alla reazione di rRT-PCR secondo le indicazioni riportate in tabella 1:

- Scongela 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 23 μl di miscela per ogni campione in provette sterili da 0,2 ml.
- In alternativa a quanto sopra descritto è possibile eseguire la preparazione della miscela dei reagenti necessari alla reazione di retro trascrizione-amplificazione con il campionatore robotizzato, per dispensazione reagenti di PCR (sistema di liquid handling tipo Cas 1200), seguendo le istruzioni riportate nel manuale d'uso dell'apparecchiatura o in analoghi documenti di struttura, "SVR IOP 14 Utilizzazione Cas 1200".

Procedere con l'allestimento dei campioni da sottoporre a rRT-PCR in una cappa dedicata alla manipolazione degli acidi nucleici, predisporre il caricamento prima dei campioni incogniti da sottoporre ad analisi, il controllo positivo di processo (PPC) il controllo negativo di processo (NPC), il controllo negativo di

amplificazione (NTC) e infine il controllo positivo di amplificazione (PTC). Riportare lo schema di caricamento su modulo specifico di laboratorio:

- Aggiungere ad ogni provetta 2 µl di RNA (nel caso del controllo NTC, verranno aggiunti 2 µl di acqua ultrapura); programmare la piattaforma real time secondo le condizioni di amplificazione riportate in tabella 2.
- Disporre le provette all'interno dello strumento e avviare il programma che soddisfi il profilo indicato in tabella 2

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

REAGENTE	CONCENTRAZIONE INIZIALE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
Acqua ultrapura sterile	/	/	13,625
PCR Buffer 5X	5X	1X	5
dNTPs mix	10 mM	0,4 mM	1
MgCl ₂	25 mM	1,25 mM	1,25
Primer LH6H7	50 µM	400 nM	0,2
Primer RH4H7	50 µM	400 nM	0,2
Sonda H7pro11	6 µM	150 nM	0,625
RNase Inhibitor	40U/µl	4 U	0,1
OneStep RT-PCR Enzime mix	/	/	1
VOLUME TOTALE	Vortexare la mix per pochi secondi e centrifugare brevemente, distribuirla in volumi di 23 µl in provette per PCR da 0,2 ml		23
VOLUME CAMPIONE RNA	Aggiungere RNA nelle rispettive provette		2
VOLUME FINALE DI REAZIONE			25

Tabella 2: Profilo termico di amplificazione

CICLO	TEMPERATURA / TEMPO	N° cicli
RT	50°C/30 min	1
ATTIVAZIONE INIZIALE	95°C/15 min	1
DENATURAZIONE	95°C/10 sec	40
ANNEALING *	54°C/30 sec	
ELONGAZIONE	72°C/ 10 sec	

***Acquisizione della fluorescenza (Data Collection)**

FAM (6 -Fluorescein Phosphoramidite): eccitazione 470 nm e lettura della fluorescenza a 510 nm

Le condizioni di rT-PCR così come la data, il target, il numero univoco identificativo dei campioni analizzati il loro ordine di caricamento sono riportati in un prospetto facente parte del foglio di lavoro "DSBIO-MOD 037

Protocollo master mix real time PCR” (SVR MOD 032 Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time 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

Al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati dal Rotor Gene 6000/RotorGene Q series software (ex Corbett, ora Qiagen).

I risultati ottenuti sono riportati in un prospetto facente parte del foglio di lavoro “DSBIO-MOD 037 Protocollo master mix real time pcr” (SVR MOD 032 Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time o analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

4.4.7 Tipizzazione (opzionale)

I campioni che risultano **POSITIVI** (vedi p. 4.5), dopo valutazione del Dirigente Responsabile vengono inviati per le successive analisi di isolamento virale ed eventuale tipizzazione con apposito foglio di lavoro, al Centro di Referenza Nazionale per AI/NDV presso il laboratorio virologia speciale della struttura SCS6 congelati, se provenienti da altri laboratori, refrigerati se provenienti da laboratori della sede (secondo IZS IDD 069 - Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria”).

4.5 Espressione dei risultati

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

- **Controllo positivo di PCR (PTC):** incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione) associato ad un valore Ct inferiore a 20;
- **Controllo positivo di processo (PPC) (solo per estrazione con sistema Microlab Starlet e/o King Fisher):** incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione) previsto ad un valore Ct inferiore a 30;
- **Controllo negativo di PCR (NTC):** assenza della curva di amplificazione; assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del reporter associato alla sonda;
- **Controllo negativo di processo (NPC):** assenza della curva di amplificazione, assenza dell'incremento regolare di fluorescenza del reporter associato alla sonda;

La prova di amplificazione viene considerata **NON CONFORME** se i controlli predisposti **non** danno i risultati attesi. Il dirigente responsabile valuta di volta in volta come procedere ed indica quali prove ripetere.

Il **campione** viene definito ed espresso sul rapporto di prova **POSITIVO** quando si ha un incremento regolare della fluorescenza associato ad un valore Ct inferiore a 35 cicli soglia;

Il **campione** viene definito ed espresso sul rapporto di prova **NEGATIVO** quando non si rileva un aumento di fluorescenza associato allo specifico fluoroforo. Campioni che presentano una curva di amplificazione irregolare si considerano aspecifici e pertanto **NEGATIVI**.

Il **campione** viene definito ed espresso sul rapporto di prova **DUBBIO** quando si rivela un aumento di fluorescenza regolare ma debole, con un valore Ct compreso tra 36 e 40. Interpellare il Responsabile di laboratorio o il suo delegato, per decidere su come procedere.

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”.

La documentazione relativa è allegata al fascicolo di validazione inerente al metodo di prova conservato presso il Laboratorio Diagnostica innovativa della SCS5.

L'incertezza di misura non è applicabile alla presente procedura.

4.7 Gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento al dedicato allegato 005 della IO IZSV 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 33):** 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 022:** MagMax™ 96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit handbook (Ambion)
- **ALL PDP 023:** RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)
- **IO IZS 033:** Modalità operative per la gestione dei rifiuti derivanti dall'attività lavorativa
- **IZS IDD 069 (PR GAC):** Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria
- **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 in uso presso i laboratori delle 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 MOD 032:** Foglio di lavoro per estrazione
- **DSBIO MOD 037:** Protocollo Master mix Real time PCR
- **SVR IOP 014:** Utilizzazione Cas 1200
- **SVR IOP 019:** Preparazione delle soluzioni
- **SVR IOP 020:** Disinfezione delle aree e delle superfici di lavoro

- **SVR IOP 022:** Utilizzazione estrattore Hamilton
- **SVR MOD 015:** Estrazione acidi nucleici
- **SVR MOD 032:** Modulo amplificazione acidi nucleici – Reazione di PCR real time
- Manuale Operativo Rotor-Gene™ (2006)