

1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice	Tecnica di prova
Gene L del genoma virale del virus del virus APMV-1 (sin. AOAV-1) codificante per la RNA polimerasi RNA dipendente	Isolati virali (tipicamente liquido allantoideo), organi/tessuti, feci, tamponi	One step reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR)

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 151 2022 Rev. 3

Bibliografia di riferimento:

- David A. Sutton, David P. Allen, Chad M. Fuller, Jo Mayers, Benjamin C. Mollett, Brandon Z. Londt, Scott M. Reid, Karen L. Mansfield, Ian H. Brown. *Development of an avian avulavirus 1 (AAV-1) L-gene real-time RT-PCR assay using minor groove binding probes for application as a routine diagnostic tool*. Journal of Virological Methods 2019, 265:9-14;
- Bernd Hoffmann, Klaus Depner, Horst Schirmeier, Martin Beer. *A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses*. Journal of Virological Methods 2006, 136 (1-2):200-9;
- OIE Manual for Terrestrial Animals, Cap 3.3.14, 2021 *Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus)*.

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR151V

3. Attrezzature, apparecchiature e consumabili

Dotazione base di un laboratorio di biologia molecolare (“**ALL PDP 279 E** - Apparecchiature, reagenti, attrezzature e materiali consumabili per biologia molecolare”), con le seguenti integrazioni e/o specifiche:

- Centrifuga con rotore per provette da 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml e 0,2 ml con velocità fino a 18000 × g
- Piattaforma per real time PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) o Rotor Gene 6000 (Corbett Research) 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	Modalità di conservazione
Intype IC-RNA	Indical Bioscience/Controllo positivo di PCR (PTC) per il controllo interno/ ALL PDP 281 - Handbook intype IC-RNA	≤ -18°C
Primer antisenso IC-2R	Commerciale 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3'	≤ -18°C
Primer antisenso NDR	Commerciale 5'-AATAGCGGACCACATCTG-3'	≤ -18°C
Primer senso IC-11F	Commerciale 5'-CAGCCACAACGTCTATATCATG-3'	≤ -18°C

Primer senso NDF	Commerciale 5'-GAGCTAATGAACATTCTTTC-3'	≤ -18°C
QuantiTect® Multiplex RT-PCR Kit	Qiagen/rRT-PCR	≤ -18°C
RNA estratto da antigene di APMV-1 (NDV Ulster 2C)	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target APMV-1/ DSBIO IOP 073 - Gestione dei materiali di riferimento per biologia molecolare	≤ -70°C
Sonda IC	Commerciale CY5-5'-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-3'-BHQ2	≤ -18°C
Sonda LproMGB	Commerciale FAM-5'-CCAATCAACTTCCC-3'-MGBNFQ	≤ -18°C
Sonda LproMGB2	Commerciale VIC-5'-AATAGTGTATGACAACAC-3'-MGBNFQ	≤ -18°C

Note: 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)
- **DSBIO IOP 006** - Manipolazione campioni presso i Laboratori e U.O. SCS5 e SCS6 e analoghi di struttura.

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 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 analogo modulo di struttura che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi. Vedere ALL PDP 1000 , prevedendo l'utilizzo del controllo interno in type IC-RNA (Indical Bioscience). Per l'estrazione di omogenato di organi/tessuti non è indicato l'utilizzo di MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystems)
----------------------------------	---

PREDISPOSIZIONE CONTROLLI	NPC	Controllo negativo di processo: campione negativo per APMV-1 (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
	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 APMV-1	Controllo positivo di amplificazione per APMV-1: campione costituito da RNA estratto da antigene di APMV-1 in assenza di IC-RNA (ALL PDP 1000) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
	PTC per IC-RNA	Controllo positivo di amplificazione per IC-RNA: campione costituito da in type IC-RNA (Indical Bioscience) diluito 1:100 in acqua per biologia molecolare nuclease-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 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 (Internal control assay pre-mix) e tabella 2 (rRT-PCR master mix), ad eccezione degli enzimi, mescolarli delicatamente 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. I volumi indicati sono sufficienti per circa 100 reazioni

Tabella 1: Internal Control Assay Mix

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

- In una provetta sterile tipo Eppendorf, preparare la mix di reazione 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 20 µl di master mix per ogni campione in provette ottiche sterili da 0,2 o da 0.1 ml

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

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione
Nuclease free water	/	/	1,25
2X QuantiTect Multiplex RT-PCR buffer	2X	1X	12,5
NDF	12,5 µM	500 nM	1
NDR	12,5 µM	500 nM	1
LPro MGB	5 µM	200 nM	1
LPro MGB2	5 µM	200 nM	1
Internal control assay pre-mix	-	-	2
QuantiTect Multiplex RT Mix			0,25
Volume totale master mix			20
Acidi nucleici/RNA			5
Volume finale			25

		<p>Sotto cappa biologica a flusso laminare dedicata alla dispensazione del campione:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aggiungere 5 µl di template (campioni e controlli) • Centrifugare per pochi secondi <p style="text-align: center;">Amplificazione</p> <p>Tabella 3: Profilo termico di amplificazione</p> <table border="1" data-bbox="619 600 1401 864"> <thead> <tr> <th>Fase</th> <th>Temperatura/Tempo</th> <th>N. cicli</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Reverse transcription</td> <td>50°C/20 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>PCR initial activation step</td> <td>95°C/15 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Denaturation</td> <td>94°C/45 sec</td> <td rowspan="2">40</td> </tr> <tr> <td>Annealing/extension*</td> <td>50°C/45 sec</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Acquisizione della fluorescenza nei canali green (FAM), yellow (VIC) e red (Cy5)</p>	Fase	Temperatura/Tempo	N. cicli	Reverse transcription	50°C/20 min	1	PCR initial activation step	95°C/15 min	1	Denaturation	94°C/45 sec	40	Annealing/extension*	50°C/45 sec
Fase	Temperatura/Tempo	N. cicli														
Reverse transcription	50°C/20 min	1														
PCR initial activation step	95°C/15 min	1														
Denaturation	94°C/45 sec	40														
Annealing/extension*	50°C/45 sec															
	<p>Analisi dei risultati</p>	<p>Moduli per la tracciabilità della seduta: “DSBIO MOD 037” o analogo modulo di struttura.</p> <p>Al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati da Rotor Gene 6000/Rotor Gene-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>ATTIVITA' SUCCESSIVE ALL'ESITO</p>	<p>Tipizzazione, isolamento e sequenziamento</p>	<p>I campioni che risultano POSITIVI (vedi p. 8.2), dopo valutazione del <u>Responsabile di Laboratorio</u> o un suo delegato vengono sottoposti ad ulteriori approfondimenti diagnostici per l’identificazione del patotipo virale e sequenziamento.</p> <p>Nel caso positività in uccelli domestici, i campioni possono essere sottoposti ad isolamento virale e diagnosi differenziale. In caso di positività in uccelli selvatici, l’isolamento verrà effettuato su indicazione del <u>Responsabile di Laboratorio</u> o un suo delegato.</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)	Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo Cy5 associato alla sonda IC, caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica), in tutti i campioni	Ct ≤ 30 In caso di IC con Ct > 30 o negativo, associato ad un risultato positivo per APMV-1, 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 APMV-1, 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 ripetutamente 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 dei fluorofori FAM e VIC associati alle sonde LPro MGB e LPro MGB2 ed assenza di curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica). Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo Cy5 associato alla sonda IC, caratterizzato da curva sigmoideale (o logaritmica)	Ct ≤ 30	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, VIC e Cy5 associati alle sonde LPro MGB, LPro MGB2 ed IC, 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 APMV-1	Incremento regolare della fluorescenza dei fluorofori FAM e VIC associati alle sonde LPro MGB e LPro MGB2 caratterizzato da curve sigmoidali (o logaritmiche)	Ct ≤ 25	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC
Controllo positivo di PCR (PTC) per IC	Incremento regolare della fluorescenza del fluoroforo Cy5 associato alla sonda IC,	Ct ≤ 30	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo

	caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica)		controllo dello stock di intype IC-RNA
--	--	--	--

8.2 Espressione dei risultati

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
Campione pervenuto non idoneo	Inadatto*	Inadatto Il <u>Responsabile di Laboratorio</u> può aggiungere nel campo “valore” di Izilab la motivazione della non idoneità del campione
Assenza dell’incremento regolare di fluorescenza per entrambi i fluorofori FAM e VIC associati alle sonde LPro MGB e LPro MGB2 ed assenza di curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche), 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 di almeno uno dei due fluorofori FAM e VIC associati alle sonde LPro MGB e LPro MGB2, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con un valore di Ct > 35, in presenza di IC conforme	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 della fluorescenza dei due fluorofori FAM e VIC associati alle sonde LPro MGB e LPro MGB2 ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), in presenza di IC conforme	Negativo	Negativo
Incremento regolare della fluorescenza di almeno uno dei due fluorofori FAM e VIC associati alle sonde LPro MGB e LPro MGB2, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con un valore di Ct ≤ 35, indipendentemente dalla conformità di IC	Positivo	Positivo

*Il campione non viene sottoposto ad analisi

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 virus APMV-1.

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 "PR 09 – Gestione dei rifiuti", fare riferimento 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	02.12.19	Revisione per inserimento metodo di estrazione automatizzato	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci
02	09.06.20	Revisione per inserimento controllo interno e aggiornamento kit di estrazione	Dr.ssa G. Bedendo Dr. A. Fortin	Dr.ssa A. Tondo Dr.ssa P. Carnieletto	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci
03	05.05.22	Revisione layout, scorporazione della fase di preparazione del campione e di estrazione nell'ALL PDP 1000, modifica dei controlli e dei criteri di accettabilità	Dr.ssa V. Panzarin Dr. A. Fortin	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa A. Granato	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli