

# **PDP VIR 151**

## **Rilevazione del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1) mediante rRT-PCR**

### **0. Matrice delle revisioni**

Rev.	Data	Descrizione	Redatto da	Verificato da	Approvato da
00	18.10.17	Prima emissione	Dr.ssa I. Monne Dr. A. Fortin	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa M. Ustulin	Direttore Sanitario Dr. S. Marangon
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

### **1. Scopo e campo di applicazione**

La presente procedura ha lo scopo di definire il percorso analitico per la rilevazione del RNA del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1) mediante Real Time Reverse Transcriptase PCR qualitativa (rRT-PCR) in campioni derivanti da specie aviare.

Le tipologie di campioni sottoposte ad analisi sono liquido allantoideo, omogenato di organi/tessuti (cervello, polmone, intestino), feci, tamponi cloacali, tamponi tracheali.

Il target è il gene L che codifica per la polimerasi del virus APMV-1.

### **2. Documenti di riferimento**

- Chad M. Fuller, Lina Brodd, Richard M. Irvine, Dennis J. Alexander, Elizabeth W. Aldous. Development of an L gene real-time Reverse-Transcription PCR assay for the detection of Avian Paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. Archives of Virology (2010) 155:817-823 DOI: 10.1007/s00705-010-0632-1
- 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) Mar;265:9-14 DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.12.001.
- APMV-1 screening real time PCR SOP Reference: VI.570 Edition 8 SOP template version 17.1 (Issued 16-Jun-15)
- Fascicolo di validazione del metodo VIR151V

### **3. Definizioni e acronimi utilizzati**

- **APMV-1:** Avian Paramyxovirus Serotype 1
- **CSP:** Centro Servizi alla Produzione dell'IZSVe
- **EID50:** Embryo infectious dose 50
- **LoD:** Limit of detection
- **NDV:** Newcastle Disease Virus

Per le altre 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 all'istruzione "DSBIO IOP 007 - Istruzione per la preparazione delle soluzioni in uso presso i laboratori delle SCS5 e SCS6", che costituiscono parti integranti della presente 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 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**

- Biglie d'acciaio sterili (5mm)
- Bilancia (risoluzione 1 mg)
- Cappa biologica a flusso laminare
- Centrifuga con rotore per provette da 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 15 ml e 50 ml con range di velocità fino a 11000xg
- 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)
- Elution microtubes CL 96 (Qiagen)
- Estrattore automatico QIASymphony (Qiagen) con relativi puntali filter-tips da 200 e 1500  $\mu\text{l}$
- Frigorifero tra  $+ 2^{\circ}\text{C}$  e  $+ 8^{\circ}\text{C}$
- Micropipette monocanale (range da 0,5 a 1000  $\mu\text{l}$ ) con relativi puntali sterili (DNase/RNase free)
- Micropipette multicanale (range da 0,5 a 50  $\mu\text{l}$ ) con relativi puntali sterili (DNase/RNase free)
- Mortaio e pestello sterili
- Omogenizzatore TissueLyser II (Qiagen)
- Piattaforma per real time PCR Rotor Gene Q (Qiagen), Rotor Gene 6000 (CORBETT, AUSTRALIA)
- Pinze e forbici sterili
- Provette sterili da 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 15 ml e 50 ml
- Provette trasparenti sterili per PCR da 0,2 ml
- Vortex
- Dispositivi di protezione individuale (DPI) indicati al punto 4.3.

Per il corretto utilizzo delle apparecchiature è necessario fare riferimento ai relativi manuali d'uso, che riportano le caratteristiche prestazionali e, ove previste, istruzioni operative (IO e IDD) e procedure di taratura (PDT) per le verifiche periodiche.

#### 4.2 Reagenti/soluzioni/kit diagnostici

Nome prodotto	Fornitore / Specifiche	Modalità di conservazione
Acqua ultrapura sterile per biologia molecolare	Commerciale	Temperatura ambiente o a $\leq -18^{\circ}\text{C}$
Antigene di NDV Ulster 2C	Fornito da SCS6 U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione/ DSBIO IOP 038/ Controllo positivo di PCR (PTC)	$\leq -70^{\circ}\text{C}$
Buffer ATL	Qiagen Buffer per QIASymphony/DSBIO IOP 090 QIASYMPHONY	Temperatura ambiente
Idoneo disinfettante (Es. Virkon 1% o Sodio ipoclorito 0,6% o VI-Sept soluzione disinfettante)	Commerciale/ Pulizia e disinfezione delle superfici/ DSBIO IOP 007 oppure SVR IOP 020	Temperatura ambiente
Etanolo 70%	Commerciale/ DSBIO IOP 007/ Estrazione manuale RNA	Temperatura ambiente
Etanolo assoluto 96-100%	Commerciale	Temperatura ambiente
Intype IC-RNA	Indical Bioscience/ Controllo interno /ALL PDP 281	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA	Macherey-Nagel Commerciale/ Estrazione manuale RNA/ ALL PDP 023	Temperatura ambiente ad esclusione della DNasi che si conserva tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$ liofilizzata e a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ una volta ricostituita
PBS antibiotato sterile	Fornito da Centro servizi alla produzione (CSP)	Tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$
Polvere di quarzo	Commerciale	Temperatura ambiente
Primer senso NDF	Commerciale/ 5'- GAGCTAATGAACATTCTTTC -3'	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Primer antisenso NDR	Commerciale/ 5'- AATAGGCGGACCACATCTG -3'	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Primer senso IC-11F	Commerciale 5'-CAGCCACAACGTCTATATCATG-3'	$\leq -18^{\circ}\text{C}$
Primer antisenso IC-2R	Commerciale 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3'	$\leq -18^{\circ}\text{C}$

QuantiTect® Multiplex RT-PCR kit	Qiagen/ rRT-PCR	≤ -18°C
QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit	Qiagen/ Estrazione di acidi nucleici con estrattore automatico/DSBIO IOP 090	Temperatura ambiente
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen/ Estrazione manuale RNA/ ALL PDP 083	Temperatura ambiente ad esclusione del Carrier RNA che, una volta risospeso, viene aliquotato e conservato a ≤ -18°C
RNA estratto da antigene di NDV Ulster 2C	Controllo positivo di PCR /fornito da U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione (SCS6) /DSBIO IOP 073	≤ -70°C
Sonda LproMGB	Commerciale/ 6FAM-5'- CCAATCAACTTCCC -3'-MGBNFQ	≤ -18°C
Sonda LproMGB2	Commerciale/ VIC-5'- AATAGTGTATGACAACAC -3'-MGBNFQ	≤ -18°C
Sonda IC	CY5-5'-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-3'-BHQ2	≤ -18°C
TE pH 8 (soluzione buffer sterile)	Fornito dal Centro servizi alla produzione (CSP) o commerciale	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 (12.5 µM) e conservati a temperatura ≤ -18°C. Le sonde liofilizzate vengono ricostituite in TE e diluite in base alla concentrazione d'uso (5 µM).

Registrare le operazioni svolte nell'apposito modulo "IZS MOD 171 (PR GRMR) - Scheda di registrazione reagenti, kit e materiale di riferimento" (o analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

### 4.3 Norme di sicurezza

Accesso ai laboratori e norme di comportamento	
È 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 antifreddo
Preparazione del campione clinico per analisi biomolecolari	Utilizzare guanti monouso e maneggiare il campione sotto cappa di sicurezza biologica. 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
Utilizzo piattaforma real time	Utilizzare guanti monouso
Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici	Utilizzare guanti monouso
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 Conservazione campioni

I tamponi stemperati, i liquidi allantoidei, 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 Preparazione del campione

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.

##### Liquido allantoideo

In una provetta sterile pipettare, mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3 e 4.4.4 a seconda del metodo di estrazione scelto.

##### 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  $5 \times 5 \times 5$  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 (a seconda del 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), per omogenati di intestino in rapporto 1/4 p/v, omogeneizzare e trasferire il tutto in una provetta sterile;
- immergere gli strumenti utilizzati in Virkon all' 1%, o idoneo disinfettante;
- centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità;

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 \*PBS antibiotato in rapporto 1/3 p/v (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); per omogenati di intestino in rapporto 1/4 p/v;
- omogeneizzare a 30 Hz per 3 min;
- immergere gli strumenti utilizzati in Virkon all'1%, o idoneo disinfettante;
- centrifugare il campione per 30 secondi alla massima velocità;
- in una provetta sterile pipettare, mediante puntali sterili con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3 e 4.4.4 a seconda del metodo di estrazione scelto.

\*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 buffer di lisi) il rapporto deve rimanere comunque 1/3 p/v e per omogenati di intestino in rapporto 1/4 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
- Miscelare la sospensione mediante vortex
- In una provetta sterile pipettare mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3, 4.4.4 a seconda del metodo di estrazione scelto.

#### **Feci**

- Diluire le feci in rapporto 1/4 p/v in PBS antibiotato (a partire da un volume minimo di feci pari a 250 µl)
- Risospendere le feci accuratamente usando il vortex
- Centrifugare alla max velocità per 30 secondi
- In una provetta sterile pipettare, mediante puntale sterile con filtro, una quantità di surnatante corrispondente a quanto indicato nei paragrafi 4.4.3, 4.4.4 a seconda del metodo di estrazione scelto.

### **4.4.3 Estrazione RNA manuale**

#### **4.4.3.1 Estrazione con kit commerciale NucleoSpin® RNA (Macherey Nagel)**

Kit per l'estrazione di RNA da omogenati d'organo, feci e tamponi (tracheali/cloacali)

Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le raccomandazioni riportate nell'allegato "ALL PDP 023 - RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)"

- Per ogni campione miscelare 300 µl di Lysis Buffer RA1 con 300 µl di etanolo (70%) ed unire 6 µl di intype IC-RNA (corrispondono a 1/10 v/v di volume di eluizione come indicato nell'allegato ALL PDP 281 – Handbook intype IC-RNA )

- Aggiungere 100 µl di campione preparato come indicato al paragrafo 4.4.2
- 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 funga da controllo negativo di processo (NPC). Tale controllo sarà costituito da 100 µl di PBS antibiotato sterile o Lysis Buffer miscelato con 300 µl di Lysis Buffer RA1 del kit NucleoSpin® RNA (privo di β-mercaptoetanolo) e processato come descritto nel paragrafo 5.1 "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 +2 e +8°C nel caso di utilizzo immediato)

#### **4.4.3.2 Estrazione con kit commerciale kit QIAamp Viral RNA (Qiagen)**

Kit per l'estrazione di RNA da liquido allantoideo e tamponi (tracheali/cloacali).

- Ricostituire i reagenti e conservarli secondo le raccomandazioni riportate nell'allegato "ALL PDP 083 – QIAamp viral RNA mini Handbook"
- Preparare la miscela di buffer AVL e carrier RNA secondo l'allegato ALL PDP 083 avendo cura di sottrarre al volume ottenuto il volume necessario di intype IC-RNA pari a 6 µl per ogni campione da processare
- Aggiungere 140 µl di campione, preparato come indicato al paragrafo 4.4.2, e proseguire secondo quanto descritto nel paragrafo "Protocol: Purification of Viral RNA (Spin Protocol)" dal punto 3 come da ALL PDP 083

Allestire, insieme ai campioni da sottoporre ad analisi, un campione che funga da controllo negativo di processo (NPC): tale controllo sarà costituito similmente ai campioni diagnostici sostituendo il volume di campione con 140 µl di PBS antibiotato sterile o buffer di lisi AVL e processato come da ALL PDP 083. L'eluato contenente RNA viene conservato a ≤ -70°C fino al suo utilizzo (oppure a temperatura tra + 2°C e + 8°C nel caso di utilizzo immediato).

N.B. Le informazioni inerenti l'estrazione sono riportate in un prospetto facente parte del modulo "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 Estrazione automatica (sistema QIASymphony SP)**

- Prelevare 300 µl di preparato secondo le indicazioni del paragrafo 4.4.2 e trasferirlo in provette sterili
- Allestire, insieme ai campioni da sottoporre ad analisi, un campione che funga da controllo negativo di processo (NPC). Tale controllo sarà costituito da 300 µl di PBS antibiotato sterile o buffer di lisi.
- Aggiungere 250 µl di Lysis Buffer ATL
- Procedere con l'estrazione dei campioni come descritto nella istruzione "DSBIO IOP 090 QIASymphony SP" che è parte integrante di questa procedura
- L'eluato contenente RNA viene conservato a ≤ -70°C fino al suo utilizzo (oppure a temperatura + 2°C e + 8°C caso di utilizzo immediato)

N.B. Le informazioni inerenti l'estrazione sono riportate in un prospetto facente parte del modulo "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.

#### **4.4.5 Predisposizione dei controlli/materiali di riferimento**

Vengono predisposti i seguenti controlli:

- **Controllo negativo di processo (NPC):** costituito da PBS antibiotato sterile o Lysis Buffer Buffer di lisi processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione come descritto nei paragrafi 4.4.3, 4.4.4 a seconda del metodo di estrazione scelto
- **Controllo positivo di PCR (controllo di amplificazione, PTC):** costituito da RNA estratto da antigene virale di ceppo NDV Ulster 2C secondo le modalità descritte nel paragrafo 4.4.3 (ALL PDP 083)
- **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
- **Controllo interno (IC):** Controllo Interno esogeno (Intype-IC RNA) aggiunto nella fase di lisi di ogni campione, incluso NPC, in quantità conforme alle indicazione del fornitore pari ad 1/10 v/v di volume di eluizione (es: aggiungere 6 µl di IC per un volume finale di estrazione pari a 60 µl di RNA)

#### 4.4.6 Retrotrascrizione e 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" con le specifiche riportate in tabella 1, 2 e 3 della presente procedura.

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

Preparare la miscela "Internal Control Assay Mix" contenente la sonda e i primers specifici per il controllo interno secondo quanto riportato in Tabella 1. E' possibile utilizzare anche volumi multipli rispetto a quelli riportati in Tabella 1.

**Tabella 1 Internal Control Assay Mix**

REAGENTE	QUANTITA'
IC-11F (100µM)	5 µl
IC-2R: (100µM)	5 µl
IC-probe (100µM)	3,75 µl
Buffer di risospensione	186,25 µl
TOT	200 µl

- scongelare i reagenti, mescolarli delicatamente e centrifugarli alla massima velocità per pochi secondi;
- in una provetta sterile preparare la miscela di reazione aggiungendo i reagenti indicati in tabella 2, 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 20 µl di miscela per ogni campione in provette sterili.

**Tabella 2: Concentrazioni e volumi dei reagenti relativi alla reazione di rRT-PCR**

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl x 1 reazione
Acqua ultrapura sterile	/	/	1.25
Primer <b>NDF</b>	12.5µM	500 nM	1
Primer <b>NDR</b>	12.5µM	500 nM	1
RT-PCR master mix	2X	1X	12.5
Sonda FAM LPro MGB	5µM	200 nM	1



Sonda VIC LPro MGB2	5µM	200 nM	1
Internal Control Assay			2
Enzime mix			0.25
VOLUME TOTALE	Vortexare la mix per pochi secondi e centrifugare brevemente, distribuirla in volumi di 20 µl in provette per PCR da 0,2 ml		20
VOLUME CAMPIONE RNA	Aggiungere RNA nelle rispettive provette		5
VOLUME FINALE DI REAZIONE			25

Procedere con l'aggiunta dell'RNA estratto dai campioni da sottoporre a rRT-PCR in una cappa dedicata alla manipolazione degli acidi nucleici. Predisporre il caricamento prima dell'RNA estratto dei campioni da sottoporre ad analisi, poi del controllo negativo di processo (NPC), del controllo negativo di PCR (NTC), infine del controllo positivo PCR (PTC). Riportare lo schema di caricamento sul modulo specifico di struttura.

- aggiungere ad ogni provetta 5 µl di RNA (nel caso del controllo NTC, verranno aggiunti 5 µl di acqua ultrapura); programmare la piattaforma real time secondo le condizioni di amplificazione riportate in tabella 3;
- disporre le provette all'interno dello strumento ed avviare il programma che soddisfi il profilo riportato in tabella 3.

**Tabella 3: Profilo termico di amplificazione**

Fase	Temperatura/Tempo	N. cicli
Retrotrascrizione	50 °C/20 min	1
Attivazione Taq polimerasi	95°C/15 min	1
Denaturazione	94°C/45 sec	40
Annealing*	50°C/45 sec	

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

- **il fluoroforo FAM (6-Fluorescein Phosphoramidite)** ha eccitazione a 470 nm e lettura della fluorescenza a 510 nm;
- **il fluoroforo VIC** ha eccitazione a 530 nm e lettura della fluorescenza a 557 nm;
- **il fluoroforo Cy5 (Cyanine5)** eccitazione 625 nm e lettura della fluorescenza a 660nm.

Le condizioni di PCR così come la data, il target, il numero univoco identificativo dei campioni analizzati, il loro ordine di caricamento sono riportati nel modulo "DSBIO MOD 037 - Protocollo master mix real time PCR" (o analogo modulo di struttura) che viene conservato ai fini della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

**4.4.7 Rilevazione del prodotto di amplificazione**

Al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati dai rispettivi software (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" (o analogo modulo di struttura) che viene conservato agli effetti della rintracciabilità di tutti i dati relativi.

**N.B. Ai fini della refertazione viene riportato solamente il Ct minore fornito da una delle due sonde**

#### 4.4.8 Isolamento in colture cellulari e tipizzazione

Gli originali dei campioni **provenienti da uccelli domestici** che risultano POSITIVI alla presente procedura (vedi par. 4.5) vengono inviati refrigerati per l'isolamento virale ed eventuale tipizzazione (PDP VIR 007), al Laboratorio di Virologia speciale della struttura SCS6, secondo le indicazioni dell'istruzione "IZS IDD 003 - Documentazione identificativa dei campioni da inviare ad altri laboratori". I campioni provenienti da uccelli selvatici che risultano **POSITIVI** vengono inviati all'isolamento virale solo su indicazione del Dirigente o suo delegato.

#### 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) previsto per entrambi i fluorofori ad un valore Ct inferiore a 25
- **controllo negativo di PCR (NTC):** assenza della curva di amplificazione; assenza dell'incremento regolare di fluorescenza dei reporter associati alle sonde
- **controllo negativo di processo (NPC):** assenza della curva di amplificazione, assenza dell'incremento regolare di fluorescenza dei reporter associati alle sonde LPro MGB, LPro MGB2. Incremento regolare della fluorescenza associato alla sonda IC-probe previsto ad un valore Ct inferiore a 28
- **controllo interno (IC):** incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione) previsto ad un valore Ct inferiore a 28.

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 amplificazione è risultato non conforme;
- reazione di amplificazione, avendo cura di cambiare i reagenti, se il controllo reagenti è risultato non conforme;
- estrazione, se il controllo negativo di processo è risultato non conforme.

In caso di non conformità del solo controllo interno procedere secondo la Tabella 4

**Tabella 4 Esemplificativa in caso di IC non conforme**

CAMPIONE	IC	ESITO
Positivo	Negativo	Positivo
Negativo	Ct>28	Diluire l'RNA estratto in rapporto 1:10 in acqua ultrapura sterile (DNase/RNase free) e ripetere la reazione di amplificazione (4.4.6); se nuovamente non conforme ripetere l'estrazione (4.4.3 o 4.4.4)
Negativo	Negativo	Ripetere estrazione

**Il campione viene definito ed espresso sul rapporto di prova come POSITIVO** quando si ha un incremento regolare della fluorescenza associato ad un valore Ct inferiore a 35 cicli soglia per almeno una delle due sonde.

**Il campione viene definito ed espresso sul rapporto di prova come NEGATIVO** quando non si rileva un aumento di fluorescenza associato ad alcuno dei due fluorofori LPro MGB, LPro MGB2 in associazione con un aumento della fluorescenza legata al fluoroforo della sonda IC-probe con valore Ct inferiore a 28. Campioni che presentano una curva di amplificazione irregolare si considerano aspecifici e pertanto NEGATIVI.

**Il campione viene definito DUBBIO** quando si rivela un aumento di fluorescenza regolare ma debole, con un valore Ct compreso tra 35 e 40. Interpellare il Responsabile di laboratorio o il suo delegato, per decidere come procedere.

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

#### 4.6 Caratteristiche del metodo

Per le caratteristiche del metodo fare 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.

#### 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 "ALL 05 (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.

### 5. Documenti allegati e/o correlati

- **Manuale della Qualità MQ**
- **PR 01:** Processo Analitico
- **PR GAPP:** Processo apparecchiature
- **PR GRMR:** Processo reagenti, kit e materiali di riferimento
- **PR COMP:** Gestione delle competenze del personale
- **PR SVVP:** Gestione sviluppo, validazione e verifica prestazione dei metodi di prova
- **IO IZSV 045:** Pulizia e disinfezione delle superfici di lavoro in laboratorio biologico classe I e II e comportamento da tenersi in caso di contaminazione delle stesse da agenti biologici
- **IZS IDD 003:** Documentazione identificativa dei campioni da inviare ad altri laboratori
- **IZS IDD 015 PR SVVP:** Criteri per la definizione dei requisiti di base e per l'elaborazione dei dati per tecniche di prova in PCR qualitativa per la diagnostica e la tipizzazione (PCR, RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, real time PCR)
- **IZS MOD 031 (PR SVVP):** Dichiarazione di validazione/verifica delle prestazioni ed idoneità del metodo di prova
- **IZS MOD 171:** Scheda di registrazione reagenti, kit e materiale di riferimento
- **PDP VIR 007:** Isolamento ed diagnosi differenziale del virus della malattia di Newcastle (NDV) (DPR 657/96 GU n°300 del 23/12/1996 All. III cap. 1-2-3-5-6-7)
- **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 023:** RNA isolation user manual (Macherey-Nagel)
- **ALL PDP 083:** QIAamp Viral RNA Mini Handbook
- **ALL PDP 281:** Handbook intype IC-RNA

- **ALL 005 (IO IZSV 033):** Tipologia rifiuti standardizzati nell'ambito di metodi di diagnosi di biologia molecolare.
- **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:** Utilizzo dell'estrattore automatico QIA Symphony SP
- **DSBIO MOD 032:** Foglio di lavoro per estrazione
- **DSBIO MOD 037:** Protocollo Master mix Real time PCR