

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Pag. 1 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

IDENTIFICAZIONE VIRUS PESTE SUINA AFRICANA (PSA) MEDIANTE REAL-TIME PCR UPL WOAH MANUAL FOR TERRESTRIAL ANIMALS, VERS. 2021

QUESTO DOCUMENTO E' DI PROPRIETA' DELL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE E NE E' VIETATA LA RIPRODUZIONE ANCHE PARZIALE NON AUTORIZZATA
IL POSSESSORE E' RESPONSABILE DEL SUO IMPIEGO, DELLA RISERVATEZZA E DELLA CONSERVAZIONE.

MOTIVO DELLA REVISIONE
INSERITI I CRITERI DI ACCETTABILITÀ. TALE MODIFICA RISOLVE IL RILIEVO 10 DELLA VI ACCREDIA DI GENNAIO 2025.

REDATTO DA	APPROVATO: Resp. Art. Org.	VERIFICATO QA	AUTORIZZATO PER IL DG	DATA	N. REVISIONE
MONICA GIAMMARIOLI	FELIZIANI FRANCESCO	CAPUCCELLA MARINELLA	PEZZOTTI GIOVANNI	30/05/2025	00 <u>5</u>

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 2 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

ELENCO REVISIONI PRECEDENTI

REVISIONE NUMERO	DATA	MOTIVO DELLA REVISIONE
000	04/02/2019	Non applicabile
001	16/01/2020	Adeguamento manuale OIE, inserimento controllo di processo interno.
002	13/10/2021	Adeguate il riferimento normativo, adeguato il format, inserita sonda alternativa.
003	17/05/2022	Inserita SOP CISA-INIA. Aggiornamento manuale OIE
004	14/01/2025	Adeguamento riferimenti normativi

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 3 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

INDICE

1.	SCOPO.....	4
2.	CAMPO DI APPLICAZIONE.....	4
3.	TERMINI, DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI.....	4
4.	RIFERIMENTI.....	5
5.	PRINCIPIO	7
6.	RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PROCEDIMENTO	7
7.	REAZIONI.....	8
8.	MODALITÀ OPERATIVE.....	8
9.	ESPRESSIONE DEI RISULTATI.....	20
10.	RAPPORTO DI PROVA.....	21
11.	ARCHIVIAZIONE	21
12.	RESPONSABILITA'	21
13.	ALLEGATI	21

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 4 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

1. SCOPO

La presente procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per l'identificazione rapida del virus della Peste Suina Africana (PSA) mediante real-time PCR con l'utilizzo di una Universal Probe Library (UPL) oppure, in alternativa, di una sonda TaqMan. Definisce inoltre le relative responsabilità del personale coinvolto.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura si applica a DNA estratto da campioni di sangue con EDTA, siero, tessuti e/o omogenati d'organo di suidi e colture cellulari infette. Risulta particolarmente utile in campioni in autolisi o quando il virus non è più infettante al momento dell'arrivo del campione in laboratorio.

3. TERMINI, DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI

CEREP: Centro di Riferenza Nazionale per lo studio delle malattie da *Pestivirus* e da *Asfivirus*.

S9PESSUI: Laboratorio Nazionale di Riferenza Pesti Suine.

EURL: European Reference Laboratory for African Swine Fever.

PSA-ASF: Peste Suina Africana, African Swine Fever.

r.p.m.: rotazioni per minuto.

UI: Unità Internazionali.

UPL: Universal Probe Library, UPL probe#162 (Roche Applied Science o equivalenti). La sonda è marcata con un reporter al 5' [6-carboxy-fluorescein (FAM)] e con un quencher buio all'estremità 3'.

Ct: Threshold Cycle, ciclo soglia: è il ciclo della reazione di amplificazione real-time in cui si ottiene un segnale di fluorescenza specifico che supera il livello (threshold, soglia) di fluorescenza che è stato scelto in funzione dell'inizio della fase esponenziale di amplificazione della sequenza bersaglio.

CA+: controllo positivo di amplificazione, DNA del virus della Peste Suina Africana (PSA) appartenente a uno dei genotipi fino ad ora conosciuti, estratto da un ceppo virale propagato in coltura cellulare ed inattivato, prodotto "*in house*" dal Centro di Riferenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e da Asfivirus (CEREP) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Umbria e delle Marche Togo Rosati.

CE+: controllo positivo di estrazione, campioni costituiti da sangue, siero, tessuti e/o omogenati d'organo, colture cellulari infetti con il virus della Peste Suina Africana (PSA) appartenente a uno dei genotipi fino ad ora conosciuti, prodotti "*in house*" dal Centro di Riferenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e da Asfivirus (CEREP) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Umbria e delle Marche Togo Rosati.

CE-: controllo negativo di estrazione, campioni costituiti da sangue, siero, tessuti e/o omogenati d'organo, colture cellulari, negativi al virus della Peste Suina Africana (PSA), prodotti "*in house*" dal Centro di Riferenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e da Asfivirus (CEREP) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Umbria e delle Marche Togo Rosati.

NTC: No Template Control, controllo di reazione negativo, contenente solo la mix di reazione.

CA-: controllo negativo di amplificazione, contenente la mix di reazione e H₂O demineralizzata sterile

dNTP: desossinucleotide trifosfato.

PCR: reazione a catena della polimerasi.

Primer (oligonucleotide): filamento di acido nucleico che serve come punto di innesco nella sintesi del nuovo filamento di DNA durante la PCR.

Real-time PCR: reazione di amplificazione che consente di valutare l'aumento del prodotto di amplificazione in tempo reale (real-time), mediante l'utilizzo di una sonda marcata con un fluorocromo che si lega alla sequenza bersaglio ed emette una fluorescenza specifica nel corso della reazione stessa.

DNA: acido desossiribonucleico o deossiribonucleico. Nel caso del virus della PSA si tratta di DNA a doppia catena. È la molecola contenente l'informazione genetica del virus della PSA.

β Actina: beta-actina endogena.

ISTITUTO ZOOFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 5 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Sonda (probe): oligonucleotide complementare alla sequenza bersaglio ed in grado di ibridarsi all'interno del frammento target amplificato.

Sonda TaqMan (TaqMan probe): particolare sonda da impiegare in saggi di real-time PCR. Presenta una doppia marcatura con fluorocromi. Per la chimica su cui si basa il funzionamento di queste sonde e per la natura dei fluorocromi, il livello di fluorescenza cresce all'aumentare dell'amplificato durante i cicli di reazione e viene acquisito dallo strumento.

Quencer: fluorocromo all'estremità 3' della sonda che rende silente il segnale fluorescente del reporter fino a quando rimane legato alla sonda.

Reporter: fluorocromo all'estremità 5' della sonda responsabile dell'emissione della fluorescenza.

FAM/VIC: 2-cloro-7-felino-1,4-dicloro-6-carboxil-fluoresceina. Fluorocromo utilizzato come reporter nelle sonde (reporter).

TAMRA: fluorocromo con cui viene marcata la sonda al 3'(quencer).

ABI PRISM 7500 HT, QuantStudio 7 Flex real time PCR, CFX Opus 96 Real-Time PCR System: strumenti per la rilevazione dei dati (Applied Biosystem).

Foglio di lavoro: foglio elaborato dal Laboratorio Nazionale di Referenza Pesti Suine sul quale sono riportati tutti i dati relativi alla identificazione del campione, data di inizio e fine prova, tipo di analisi richiesta, passaggi effettuati per la sua esecuzione, data di esecuzione di ogni singolo passaggio, esito dell'analisi, eventuali note e firma dell'analista. Tale foglio viene compilato dall'analista durante lo svolgimento della prova.

S.I.G.L.A.: Sistema Informatico Gestione Laboratori di Analisi.

DV: dossier di validazione.

BSL3: laboratorio di biocontenimento di livello di biosicurezza 3.

4. RIFERIMENTI

- **Regolamenti tecnici e Norme collegate**

- WOAHP Manual for Terrestrial Animals, (<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/>)

- **Procedure collegate**

- PRQ.006: "Gestione delle apparecchiature di misura e prova"
- PRQ.007: "Manutenzione delle apparecchiature di misura e prova"
- PRQ.008: "Taratura delle apparecchiature di misura e prova"
- PRQ.010: "Uso e custodia dei campioni e dei materiali di riferimento"
- PRQ.012: "Accettazione e Refertazione"
- PRQ.013: "Validazione dei metodi di prova"
- PRQ.017: "Gestione del reagentario"
- PRQ.S.001: "Rischio biologico"
- PRQ.S.002: "Rischio da esposizione a sostanze infiammabili, pericolose, comprese quelle cancerogene e mutagene"
- PRQ.QAS.005: "Gestione e smaltimento dei rifiuti"
- PRT.PGCHIM.022: "Gestione dei campioni e dei relativi documenti."
- PRT.PGACREF.001: "Movimentazione dei campioni"
- PRT.LNRPS2.001: "Allestimento materiali di riferimento per Peste Suina Classica (PSC) e Peste Suina Africana (PSA)".
- PRT.ANMICALI.035: "Decontaminazione microbica dei laboratori"
- IO.S5BIOTEC.001 "Organizzazione e decontaminazione - laboratorio di biologia molecolare"
- POB.003: "Modalità di accesso all'area di contenimento BSL3"
- POB.004: "Norme generali di comportamento nell'area"

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 6 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- POB.005: "Gestione dei campioni afferenti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche e di competenza del CEREP"
- POB.006: "Decontaminazione di superfici, strumenti, ambienti"
- POB.007: "Stoccaggio di materiale biologico nell'aria di contenimento BSL3"
- POB.009: "Gestione dell'autoclave nell'area di contenimento BSL3"
- POB.010: "Gestione delle emergenze non epidemiche nell'area di contenimento BSL3"
- POB.011: "Gestione delle emergenze sanitarie nell'area di contenimento BSL3"
- POB.012: "Gestione e smaltimento dei rifiuti nell'area di contenimento BSL3".

• **Modulistica collegata**

- MOD.Q.643 "Foglio di lavoro identificazione virus Peste Suina Africana (PSA) mediante real-time PCR"
- MOD.Q.250 "Istruzioni d'uso dell'apparecchio"
- MOD.Q.795 "Schema piastra estrazione automatizzata"
- MOD.Q.027: "Etichetta soluzioni di lavoro"
- MOD.Q.590 "Registrazione utilizzo soluzioni di lavoro"
- MOD.Q.904: Calcolo Limit of detection/LOD per prove di biologia molecolare applicate ai tests virologici.

• **Altri riferimenti**

- Fernández-Pinero J., Gallardo C., Elizalde M., Robles A., Gómez C., Bishop R., Heath L., Couacy-Hymann E., Fasina F.O., Pelayo V., Soler A., Arias M. (2013). Molecular diagnosis of African swine fever (ASF) by a new real-time PCR using Universal Probe Library (UPL). Transbound Emerg. Dis., 60: 48-58.
- Gallardo C., Nieto R., Soler A., Pelayo V., Fernández-Pinero J., Markowska-D., Pridotkas G., Nurmoja I., Granta R., Simón A., Pérez C., Martín E., Fernández-Pacheco P., Arias M. (2015). Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. J. Clin. Microbiol., 53 (8):2555-65.
- SOP/CISA/ASF/PCR/3/ "STANDARD OPERATION PROCEDURE FOR THE DETECTION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS (ASFV) BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) USING (TaqMan probe ASF-VP72P1 or UPL commercial probe)", Centro De Investigation En Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, 28130, Madrid, Spagna. Rev. 5/2021.
- SOP/CISA/ASF/DNA EXTRACTION/1 "STANDARD OPERATION PROCEDURE FOR THE EXTRACTION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS (ASFV) DNA", Centro De Investigation En Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, 28130, Madrid, Spagna. Rev 5. 2021.
- SOP/CISA/ASF/SAMPLES/1 "STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR SAMPLES PROCESSING FOR AFRICAN SWINE FEVER (ASF) DIAGNOSIS". Centro De Investigation En Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, 28130, Madrid, Spagna. Rev 5. 2021.
- Documento CISA-INIA: Short protocol: Real-time PCR for ASFV using TaqMan probe ASF-VP72P1 EURL for ASF, INIA-CISA, Valdeolmos, Spain 19/12/2018.
- Wernike K., Hoffmann B., Kalthoff D., König P., Beer M.(2011). Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. J. Virol. Methods. 174(1-2):77-84.
- Massimo Biagetti, Massimiliano Cuccioloni, Laura Bonfili, Valentina Cekarini, Carla Sebastiani, Ludovica Curcio, Monica Giammarioli, Gian Mario De Mia, Anna Maria Eleuteri, Mauro Angeletti. Chimeric DNA/LNA-based biosensor for the rapid detection of African swine fever. Talanta, 184, 35-41, 2018.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 7 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- Istruzioni d'uso (Handbook) del kit High Pure PCR Template Preparation Kit for Commercial nucleic acid, ROCHE [Ref. 11796828001] [http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_6_8_48_1_1.html].
- Istruzioni d'uso (Handbook) del kit LightCycler 480 Probes Master kit (Roche Applied Science, Ref. 04 707 494 001, 500 reactions).
- QIAasymphony SP/AS User Manual.
- QIAasymphony DSP Virus/Pathogen MINI/MIDI Kit User Manual.
- ABI PRISM 7900/SDS User's Manual, User Bulletin, 2005.
- STEP ONE PLUS Real-Time PCR System, User's Manual, User Bulletin, 2011.
- ABI PRISM 7500 FAST REAL-TIME RT-PCR SYSTEM/SDS User's Manual, User Bulletin, 2010.
- QuantStudio 7 Flex real time PCR System, User's Manual, User Bulletin, 2013.
- CFX Opus 96 Real-Time PCR System User Manual.
- KingFisher™ Apex Purification System User Manual (Thermo Fisher Scientific™).
- DV.PRT.LNRPS2.007 "Identificazione virus Peste Suina Africana (PSA) mediante real-time PCR UPL".

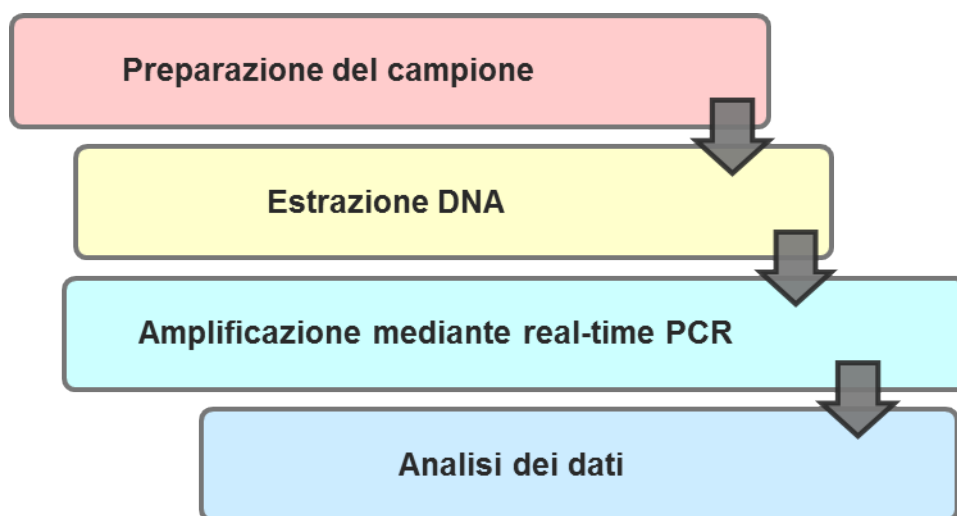
5. PRINCIPIO

La real-time PCR si basa sulla tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR). Attraverso l'uso di appropriate strategie di rilevazione di fluorescenza e di una appropriata strumentazione, può essere quantificato il numero iniziale di copie di acido nucleico (DNA) presente nel campione da analizzare in relazione al gene target di interesse.

La tecnologia dello strumento prevede l'uso di sonde ad ibridazione di tipo UPL/TaqMan sequenza specifiche. Per rilevare i prodotti di PCR viene monitorato e analizzato l'incremento della fluorescenza.

Il set di primers e la sonda UPL/TaqMan utilizzati amplificano un frammento di 68 bp della regione B646L del virus della Peste Suina Africana codificante per la proteina strutturale maggioritaria del virus (p72), in grado di identificare tutti e 24 i genotipi fino ad ora conosciuti. Questa procedura garantisce una elevata sensibilità grazie all'utilizzo combinato di primers/probe UPL o TaqMan.

6. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PROCEDIMENTO



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 8 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

7. REAZIONI

Non applicabile

8. MODALITÀ OPERATIVE

• **Condizioni ambientali**

Non sono richieste specifiche condizioni ambientali. È consigliato, al fine di ridurre il rischio di contaminazione crociata, differenziare locali/aree e adottare dispositivi di protezione individuale.

Al termine di ogni sessione di lavoro le superfici di lavoro sono sottoposte a pulizia/disinfezione e decontaminazione secondo quanto descritto nella PRT.ANIMICALI.035, IO.S5BIOTEC.001, e nella POB.006.

• **Misure di sicurezza e biosicurezza**

Nell'esecuzione della presente procedura applicare i livelli di contenimento previsti nella PRQ.S.001 e nella PRQ.S.002; e nelle POB.003, POB.004 e POB.005.

Per lo smaltimento dei campioni analizzati e di tutto il materiale utilizzato seguire quanto descritto nella PRQ.QAS.005 e nella POB.012.

• **Materiali**

- Puntali sterili RNase-free con filtro per micropipette
- Pipette graduate sterili monouso da 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml
- Provette nuclease-free tipo Eppendorf o equivalenti, volume 0,5, 1,5 e 2,0 ml DNA/RNA/RNase free autoclavate
- Tubi tipo Falcon 15 ml sterili o equivalenti
- Mortaio e pestello sterili
- Biglie metalliche per omogenizzatore (o equivalenti)
- MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml) (Applied Biosystems o equivalenti) - Piastra in plastica ottica a 96 pozzetti
- Optical Adhesive Covers PCR Compatible, DNA/RNA/RNase free (Applied Biosystems o equivalenti) – Film adesivi PCR compatibili o equivalenti
- Supporti in plastica per piastre di real-time PCR
- Optical support base per real-time PCR Systems
- Microamp optical tubes (Applied Biosystems) – Tubi ottici o equivalenti
- Microamp optical caps (Applied Biosystems) – Tappi ottici o equivalenti
- Supporti autoclavabili per provette da 1,5 – 2,0 ml
- Guanti in lattice o nitrile senza polvere
- Scatola refrigerata
- Piastre Petri
- Forbici e pinze sterili
- Parafilm
- Sacchetti autoclavabili di varie dimensioni
- QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit e QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 9 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- **Materiali per estrazione automatizzata (QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini e Midi Kit - Qiagen)**
 - 8-Rod Covers
 - Filter-Tips, 200 µl and 1500 µl
 - Sample Prep Cartridges, 8-well
 - Elution Plates
- **Materiali per estrazione automatizzata (KingFisher™ Apex Purification System/ MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit – Applied Biosystem™):**
 - Kingfisher™ deep well: piastre a 96 pozzetti per estrazione.
 - Kingfisher™ 96 tip comb: puntali per il magnete Kingfisher.
 - Plate per eluizione da 200 µl per Kingfisher™.
 -
- **Apparecchiature**
 - Agitatore a vibrazione (vortex)
 - Cappa chimica
 - Cappa a flusso laminare
 - Cappetta per PCR
 - Congelatore -20°C +5°C
 - Congelatore -75C ±15°C
 - Frigorifero +5°C ±3°C
 - Estrattore automatico QIAAsymphony SP/AS (QS) (QIAGEN)
 - Estrattore automatico Thermo Scientific™ KingFisher™ Apex Purification System
 - Microcentrifuga con rotori per provette da 1,5 e 2,0 ml
 - Centrifuga refrigerata da banco per provette da 15 ml
 - Bilancia tecnica
 - pH-metro
 - Pipettatore automatico
 - Micropipette volume variabile 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
 - Micropipette multicanale volume variabile 0,5-10 µl, 10-100 µl
 - Omogenizzatore a biglie metalliche
 - Strumento di real-time PCR e computer ad esso collegato
 - Thermomixer +16°C/+56°C /+70°C (+ 2°C)

Per la gestione, manutenzione e taratura delle apparecchiature attenersi a quanto indicato nelle PRQ.006, PRQ.007, PRQ.008 e POB.009.

- **Reagenti e soluzioni di lavoro**
 - **Reagenti e materiali forniti dal kit di estrazione manuale (High pure PCR template preparation kit - Roche)**
 - Binding Buffer/soluzione tampone di legame
 - Proteinase K/ Proteinasi K
 - Inhibitor removal Buffer/ soluzione tampone di rimozione degli inibenti
 - Wash buffer/ soluzione tampone di lavaggio

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 10 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- High Pure Filter Tube/ colonnine High Pure Filter
- Elution buffer/soluzione tampone di eluizione
- Collection tubes (2 ml) /tubi di raccolta (2 ml)

- **Reagenti e materiali forniti dal kit estrazione automatizzata (QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Mini e Midi Kit - Qiagen)**
 - Buffer AVE
 - Carrier RNA
 - Enzyme rack (ER)
 - Piercing Lid (PL)
 - Reagent Cartridge (RC)
 - Reuse Seal Set (RSS)
 - Buffer ATL (Qiagen)
 - Buffer ACL (Qiagen)
 - Proteinasi K (PK)

- **Reagenti e materiali forniti dal kit estrazione automatizzata MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit - Applied Biosystem™**
 - MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Lysis/Binding Solution Concentrate.
 - MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Wash solution 1 Concentrate.
 - MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Wash solution 2 Concentrate.
 - MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Elution buffer.
 - MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Nucleic Acid Binding Beads.
 - MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Lysis Enhancer.

- **Reagenti inclusi nella LightCycler 480 Probes Master kit (Roche Applied Science)**
 - LightCycler 480 Probes Master 2X
 - LightCycler 480 Probes Master; H₂O PCR-grade

- **Altri reagenti**
 - Polvere di quarzo sterile
 - Sodio cloruro (Tampone fosfati di base - PBS)
 - Potassio cloruro (Tampone fosfati di base - PBS)
 - di-Sodio idrogeno fosfato di-idrato (Tampone fosfati di base - PBS)
 - Potassio fosfato monobasico (Tampone fosfati di base - PBS)
 - Antibiotici (Penicillina e Streptomycin)
 - Ipoclorito di sodio al 4,5%
 - Isopropanolo (>99%)
 - Etanolo assoluto (>99%)
 - Oligonucleotidi/primers sintetici liofilizzati (sequenza riportata in tabella 1)
 - Probe o Sonda TaqMan liofilizzata (sequenza riportata in tabella 1)
 - UPL-162 probe (Roche Applied Science, Ref. 04694490001)
 - Soluzione fisiologica
 - Rely+On Virkon polvere (Du Pont) o equivalenti

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 11 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- Acqua demineralizzata sterile
- PBS tablets, EMD Millipore Corp., o prodotto equivalente

Tabella 1a: Sequenza dei primers/probe utilizzati nella real-time PCR UPL (sonda UPL)

Gene target	Nome primer	Sequenza primer/probe
VP72	ASFV-162/I2 F	5'-CCCAGGGRGATAAAATGACTG-3' (<i>sense</i>)
	ASFV-162/V2 R	5'-CACTRGTTCCCTCCACCGATA-3' (<i>antisense</i>)
	UPL-162	5'-FAM-GGCCAGGA-3'-[dark quencer]
β-actina	ACT-162-F	5'-GGATGCAGAAGGAGATCACG-3' (<i>sense</i>)
	ACT-162-R	5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAG3' (<i>antisense</i>)
	UPL-162	5'-FAM-GGCCAGGA-3'- [dark quencer]

Tabella 1b: Sequenza dei primers/probe utilizzati nella real-time PCR UPL (sonda TaqMan)

Gene target	Nome primer	Sequenza primer/probe
VP72	ASFV-162/I2 F	5'-CCCAGGGRGATAAAATGACTG-3' (<i>sense</i>)
	ASFV-162/V2 R	5'-CACTRGTTCCCTCCACCGATA-3' (<i>antisense</i>)
	ASFV-VP72-P1	5'-FAM-TCCTGGCCRACCAAGTGCTT-3'- [dark quencer]

• **Soluzioni di lavoro**

- Oligonucleotidi/primer stock 100 pmol/μl
- Oligonucleotidi/primer soluzione di lavoro 20 pmol/μl
- Sonda TaqMan stock/soluzione di lavoro 10 pmol/μl
- Soluzione di Ipoclorito di sodio allo 0,4%
- Soluzione di Etanolo al 70%
- Soluzione Virkon Rely+On 1%
- Soluzione stock Penicillina 10.000 UI/ml (100X)
- Soluzione stock Streptomicina 10 mgr/ml (100X)
- Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 1,5 M (10X)
- Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 (1X)
- Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 0,15 M (1X) antibiotato (Streptomicina 100 microgrammi/ml + Penicillina 100 UI/ml)
- Tampone fosfato di base (PBS) ottenuto da tablets per PBS, pH 7,4 (1X)

Per tutte le soluzioni di lavoro impiegate nella fase di estrazione si rimanda alle istruzioni dei kit High pure PCR Template Preparation Kit (Roche), QIA Symphony DSP Virus/Pathogen Mini e Midi Kit (Qiagen), MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystem™).

Per la gestione dei reagenti e delle soluzioni di lavoro attenersi a quanto indicato nella PRQ.017.

ISTITUTO ZOOFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 12 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- **Materiali di Riferimento**

- Sangue+EDTA, siero, tessuti e/o omogenati d'organo di suidi e colture cellulari infette con il virus della Peste Suina Africana prodotti "*in house*" dal CEREP (CE+)
- Sangue+EDTA, siero, tessuti e/o omogenati d'organo di suidi e colture cellulari negativi al virus della Peste Suina Africana prodotti "*in house*" dal CEREP (CE-)
- DNA estratto dallo stipite di riferimento BA71V, ottenuto da coltura cellulare infetta, prodotto "*in house*" dal CEREP (CA+).

I materiali di riferimento sono prodotti secondo quanto descritto nella PRT.LNRPS2. 001. I controlli di estrazione (CE+/CE-) possono essere utilizzati in associazione al controllo di processo interno (β -actina). Poiché la prova prevede il controllo di processo β -actina, è consigliabile inserire anche un solo unico controllo di estrazione, positivo e negativo, per seduta analitica.

Per la gestione dei materiali di riferimento attenersi a quanto indicato nella PRQ.010.

- **Identificazione e gestione dei campioni da sottoporre a prova**

Presso i singoli laboratori il campione, identificato con il numero di accettazione secondo la PRQ.012, viene gestito in conformità e nel rispetto di quanto previsto dalla PRT.PGCHIM.022 e dalla POB.005.

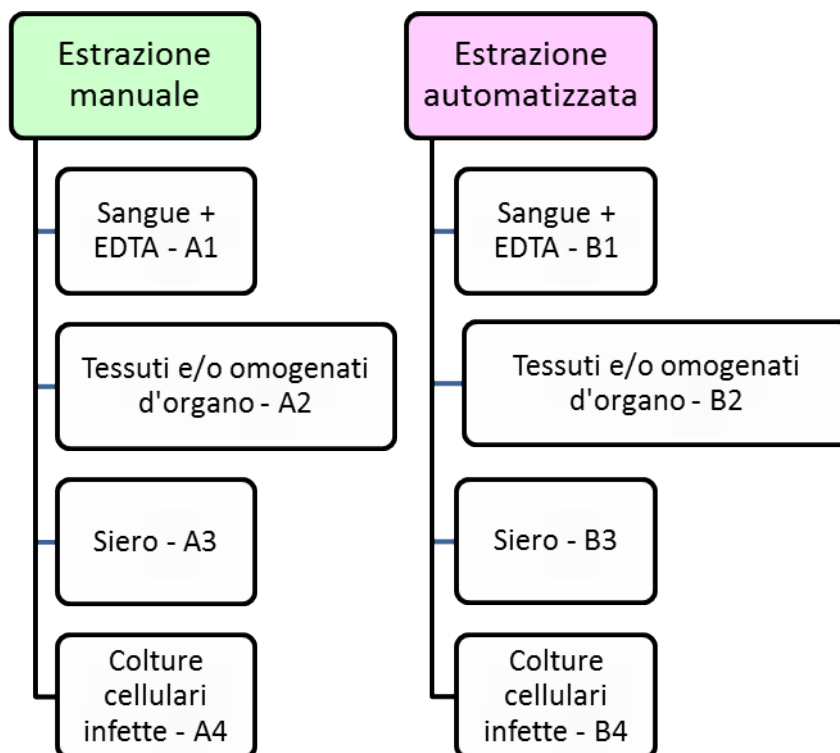
- **Preparazione del campione**

All'inizio di ogni sessione di lavoro:

- compilare il MOD.Q.643, nel quale è necessario riportare il numero di accettazione, il numero progressivo del campione, la data in cui si esegue la procedura, la sigla dell'analista che la esegue e tutte le informazioni relative ai reagenti/lotti materiali di riferimento;
- preparare per ciascun campione una provetta riportando il numero progressivo indicato nel MOD.Q.643. La preparazione del campione verrà eseguita con modalità diverse a seconda della diversa tipologia di matrice (Figura 1) da sottoporre a prova come di seguito riportato.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 13 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Figura 1: Elenco matrici



Sangue + EDTA

A1 - Prelevare 200 µl di **sangue** in EDTA, porlo in una provetta tipo eppendorf numerata, ed estrarre secondo il protocollo di estrazione manuale.

B1 - Prelevare il volume necessario seguendo secondo quanto indicato nella tabella 2, trasferirlo in una provetta tipo eppendorf da 2 ml precedentemente preparata e numerata e procedere secondo il protocollo selezionato.

Tessuti e/o omogenati d'organo

Gli omogenati d'organo possono essere preparati o manualmente mediante un mortaio e polvere di quarzo (1) o mediante un omogeneizzatore a biglie magnetiche (2). In entrambi i casi, indipendentemente dalla preparazione della sospensione di tessuto/organo, si può procedere con una estrazione manuale o estrazione automatizzata.

1. Sospensione manuale al 10%

- prelevare circa 1 gr di tessuto e porlo in un mortaio sterile
- omogenare con un pestello sterile in polvere di quarzo autoclavata
- aggiungere 10 ml di PBS (1X) antibiotato
- trasferire l'omogenato in un tubo tipo falcon sterile da 15 ml
- centrifugare il campione a 1.200 x g per 10 minuti
- recuperare il supernatante

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 14 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- prelevare l'aliquota per estrazione e mantenere il volume rimanente a -20°C fino al termine della prova.

2. Omogeneizzazione con biglie metalliche

- prelevare circa 0,5 gr di organo e porli in una provetta tipo eppendorf da 2,0 ml;
 - aggiungere 1,2 ml di PBS (1X) antibiotato ed inserire una biglia metallica;
 - inserire la provetta nell'alloggiamento dello strumento e selezionare il programma desiderato, tra quelli sotto indicati, a seconda dell'organo da omogeneizzare:
 - cervello/milza: 1.000 r.p.m. per 10 minuti (programma 1)
 - annessi fetali/fegato/mammella/polmone/trachea: 1.200 r.p.m. per 10 minuti (programma 2). Nel caso in cui il programma 2 non abbia prodotto una omogeneizzazione sufficiente: 1.800 r.p.m. per 10 minuti (programma 3)
 - al termine della operazione di omogeneizzazione, prelevare la provetta e centrifugare il campione a 1.000/1.200 x g per 5 minuti;
 - prelevare l'aliquota per l'estrazione e mantenere il volume rimanente a -20°C fino al termine della prova.
- **A2** - Prelevare 200 µl di **tessuto e/o omogenato d'organo**, porlo in una provetta tipo eppendorf numerata, ed estrarre secondo il protocollo di estrazione manuale.
 - **Siero**
 - A3** - Prelevare 200 µl di **siero**, porlo in una provetta tipo eppendorf numerata, ed estrarre secondo il protocollo di estrazione manuale.
 - **Culture cellulari infette e non**
 - A4** - Prelevare 200 µl di coltura cellulare infetta/ciolisato, porlo in una provetta tipo eppendorf numerata, ed estrarre secondo il protocollo di estrazione manuale.

B2 - Prelevare il volume necessario seguendo secondo quanto indicato nella tabella 2, trasferirlo in una provetta tipo eppendorf da 2 ml precedentemente preparata e numerata e procedere secondo il protocollo selezionato.

B3 - Prelevare il volume necessario seguendo secondo quanto indicato nella tabella 2, trasferirlo in una provetta tipo eppendorf da 2 ml precedentemente preparata e numerata e procedere secondo il protocollo selezionato.

B4 - Prelevare il volume necessario seguendo secondo quanto indicato nella tabella 2, trasferirlo in una provetta tipo eppendorf da 2 ml precedentemente preparata e numerata e procedere secondo il protocollo selezionato.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 15 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Nell'eventualità che i campioni analizzati mostrino esito positivo, gli stessi devono essere aliquotati e stoccati secondo quanto previsto dalla POB.007.

• Esecuzione della prova

- La fase di estrazione dovrà essere eseguita sotto cappa a flusso laminare presso il laboratorio di massimo contenimento BSL3 se in estrazione manuale o in alternativa direttamente in estrattore automatizzato, previa **inattivazione a 70°C per 30 min.** sotto cappa a flusso laminare sempre presso il laboratorio BSL3.
- Per ciascuna seduta di estrazione, è consigliabile inserire anche una provetta per il controllo di estrazione positivo (CE+) e una per il controllo di estrazione negativo (CE-).
- Si raccomanda di testare i campioni rappresentati da tessuti/organi anche diluiti 1:10 contestualmente al campione tal quale.

1. Estrazione manuale - High pure PCR template preparation kit – Roche.

- a. Equilibrare i campioni da analizzare a temperatura ambiente.
- b. Allestire il controllo positivo e negativo di estrazione.
- c. Controllare che il wash buffer e l'inhibitor removal buffer siano stati preparati come indicato dalle istruzioni del kit.
- d. Preriscaldare l'elution buffer a 70°C.
- e. Numerare le provette tipo eppendorf da 1,5 ml per eseguire l'estrazione secondo quanto riportato nel MOD.Q.127
- f. Pipettare 200 µl di campione in una provetta tipo eppendorf da 1,5 ml opportunamente numerata per il numero di campioni in esame e i relativi controlli di estrazione CE+ e CE-.
- g. Aggiungere 200 µl di binding buffer e 40 µl proteinasi K e mescolare immediatamente.
- h. Incubare a temperatura di 70°C per 10 minuti in thermomixer.
- i. Spinnare brevemente le eppendorf per eliminare le gocce dal tappo.
- j. Aggiungere 100 µl di isopropanolo.
- k. Trasferire il contenuto della eppendorf in colonna (High Pure filter Tube) precedentemente inserita in un tubo di raccolta, chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 8.000 g.
- l. Scartare il filtrato e porre la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.
- m. Con attenzione aprire il tappo della colonnina, trasferire la soluzione rimasta e ripetere le stesse operazioni del punto j.
- n. Con attenzione aprire la colonnina ed aggiungere 500 µl di Inhibitor Removal Buffer, chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 8.000 g. Scartare il filtrato e porre la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.
- o. Con attenzione aprire la colonnina ed aggiungere 450 µl di Wash buffer e centrifugare per 1 minuto a 8.000 g; ripetere per due volte questo step.
- p. Centrifugare per 1 minuto a alla massima velocità per eliminare i residui di Wash buffer e porre la colonnina in una eppendorf da 1,5 ml.
- q. Con attenzione aprire la colonnina ed aggiungere 50 µl di Elution Buffer preriscaldato a 70°C. Chiudere il tappo, incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugare per 1 minuto a 8.000 g.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 16 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- r. Recuperare l'eluato ed eliminare la colonnina. Stoccare il DNA estratto a -20°C fino al momento dell'amplificazione.

- **Estrazione automatizzata – QIASymphony SP (QS) - QIAGEN**

In base a una valutazione del rischio, è possibile utilizzare gli estrattori automatici anche se ubicati in una struttura diversa dal laboratorio di massimo contenimento - BSL3, purché sussistano adeguate misure di biosicurezza (per esempio, inattivazione/lisi del campione da eseguirsi in BSL3).

Compilare il modulo MOD.Q.795, inserendo il numero progressivo della piastra di eluizione, lo strumento utilizzato per l'estrazione, la data e la firma dell'operatore e riportare la disposizione dei campioni nella piastra di eluizione identificandoli con il numero progressivo o il numero di accettazione/progressivo SIGLA.

1. Fase di inattivazione/lisi del campione

- Controllare che l'RNA carrier sia stato preparato come indicato dalle istruzioni del kit.
- Prelevare i campioni, precedentemente inattivati e porli in provette tipo eppendorf da 2 ml secondo quanto indicato in tabella 2.
- Preparare la miscela di reagenti di inattivazione/lisi come indicato in tabella 2 per il numero totale dei campioni più il 10%.
- Aggiungere a ciascun campione il volume di miscela idoneo come indicato in tabella 2.

Tabella 2: Protocollo di inattivazione/lisi dei campioni

Kit	QIASymphony DSP Virus/Pathogen MINI	QIASymphony DSP Virus/Pathogen MIDI
Protocollo	Complex 200_OBL_V4_DSP	Complex 400_OBL_V4_DSP
Reagente	CAMPIONE SINGOLO (µL)	CAMPIONE SINGOLO (µL)
Proteinasi K	20	40
ATL	100	165
AVE	117	117
RNA Carrier	3	3
ACL	190	315
SF	0	200/0
TOTALE MIX	430	640
CAMPIONE	200	200/400
TOTALE	630	1040
TRATTAMENTO	15 min. a 68°C	
	Spinnare alla massima velocità	

- Miscelare pipettando facendo attenzione a non produrre schizzi e schiuma
- Incubare in thermomixer a 68°C per 15 minuti
- Spinnare brevemente alla massima velocità le provette per eliminare le gocce dal tappo

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 17 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- h. Sanitizzare le provette, porle in un rack e poi all'interno di una busta trasparente chiusa con fascetta
- i. Procedere all'estrazione dell'RNA con estrattore automatico.

2. Fase di estrazione degli acidi nucleici

- a. L'estrazione viene eseguita secondo le modalità descritte nello User Manual del QS utilizzando i protocolli di estrazione indicati in tabella 2.
 - b. Conservare gli acidi nucleici estratti in frigorifero se si procede subito alla fase successiva di amplificazione o in alternativa conservarli a -20°C fino al momento dell'amplificazione.
- **Estrazione dell'RNA virale con estrattore automatico KingFisher™ Apex Purification System e Pathogen RNA/DNA Kit**
 - **Preparazione dei reagenti:**
 - *Wash Solution 1*: primo utilizzo, aggiungere 125 ml di isopropanolo (100%) alla bottiglia identificata con la dicitura Wash Solution 1 Concentrate, agitare per inversione per 5 minuti, marcare la bottiglia per indicare che è stato aggiunto l'isopropanolo.
 - *Wash Solution 2*: primo utilizzo, aggiungere 232 ml di etanolo (100%) alla bottiglia identificata con la dicitura Wash Solution 2 Concentrate, agitare per inversione per 5 minuti, marcare la bottiglia per indicare che è stato aggiunto l'etanolo.
 - **Allestimento seduta di estrazione:**
 - Preparare le piastre di lavaggio 1: identificare due "deep well" rispettivamente con la sigla W1/1 e W1/2 e in ciascuna, dispensare per ogni pozzetto, 300 µl di Wash Solution 1/1" tramite la multicanale con distanziatore o micropipetta da 1000 µl, secondo lo schema riportato nel MOD.Q.877. Coprire le piastre con parafilm.
 - Preparare le piastre di lavaggio 2: identificare due "deep well" rispettivamente con la sigla W2/1 e W2/2 e dispensare, in ciascuna, per ogni pozzetto, 450 µl di Wash Solution 2 tramite la multicanale con distanziatore o micropipetta da 1000 µl, secondo lo schema riportato nel MOD.Q.877. Coprire le piastra con parafilm.
 - Preparare la piastra di eluizione: identificare una "piastra di eluizione" con la data dell'analisi e dispensare per ogni pozzetto 90 µl di MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit Elution buffer secondo lo schema riportato nel MOD.Q. 877. Coprire la piastra con parafilm.
 - Preparare la soluzione Bead Mix mescolando mediante vortex 10 µl Biglie Magnetiche (Nucleic Acid Binding Beads) e 10 µl Lysis Enhancer per ogni campione analizzato.
 - In un tubo sterile preparare la soluzione Lysis/Binding solution pipettando nell'ordine indicato: 250 µl di Lysis/Binding Solution Concentrate, 2 µl di Carrier RNA, 9 µl di intype IC-RNA (corrispondente a 1:10 del volume di eluizione) e 250 µl di isopropanolo al 100% secondo le istruzioni del kit.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 18 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

- In una deep well pulita dispensare per ogni pozzetto 20 µl di Bead Mix, 200 µl di campione e 500 µl di Lysis/Binding Solution secondo lo schema riportati nel MOD. 826.

- Preparare la Tip Comb posizionando i puntali nella piastra.

- Accendere l'estrattore KingFisher™ Apex Purification System. Selezionare il protocollo MagMax_Pathogen (MagMax_Pathogen_High volume 96 DW). Caricare le piastre nell'ordine e nella posizione indicati dalla macchina. Avviare il programma.

- Una volta estratto l'RNA è pronto per la PCR. Conservare l'RNA purificato a +4 °C per pochi giorni, a -20 °C per 1 mese o a -80°C per periodi di tempo più lunghi.

• **Amplificazione del DNA del virus della PSA mediante real-time PCR.**

- Equilibrare i reagenti della real-time PCR a temperatura ambiente.
- Effettuare la preparazione della “mix di amplificazione” della real-time PCR sotto cappa a flusso laminare o capetta da PCR, avendo cura di non esporre la sonda fluorescente alla luce diretta.
- Dopo l'uso gettare tutti i materiali utilizzati in un sacchetto autoclavabile. I rifiuti verranno gestiti come previsto dalla POB.012.
- Pulire con ipoclorito di sodio allo 0,4% le superfici di appoggio ed accendere la lampada UV per circa 20-30 minuti.
- Allestire una miscela di reazione separata per ciascun target (PSA e βactina), tenendo conto del numero totale dei campioni da saggiare, del controllo positivo di estrazione (CE+), del controllo negativo di estrazione (CE-) e dei controlli positivo di amplificazione (CA+) e negativi di amplificazione (NTC e CA-) introdotti nella fase di real-time PCR. Inoltre si deve tener conto che ogni campione e ogni controllo saggiato devono essere allestiti in duplicato.

Metodica A - Miscela di reazione della real-time PCR UPL target PSA

Reagenti	µl per 1 campione
LightCycler 480 Master Mix (2X)	10
Primer ASFV-162/I2 F (20 pmol/µl)	0,4
Primer ASFV-162/V2 R (20 pmol/µl)	0,4
UPL-162 probe (10 pmol/µl)	0,2
Acqua demineralizzata sterile	7
Totale master mix	18
DNA	2 µl
Volume totale	20

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 19 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Metodica A - Miscela di reazione della real-time PCR UPL target β actina

Reagenti	μ l per 1 campione
LightCycler 480 Master Mix (2X)	10
Primer ACT-162-F (20 pmol/ μ l)	0,4
Primer ACT-162-R (20 pmol/ μ l)	0,4
UPL-162 probe (10 pmol/ μ l)	0,2l
Acqua demineralizzata sterile	7
Totale master mix	18
DNA	2 μl
Volume totale	20

Metodica B - Miscela di reazione della real-time PCR UPL target PSA

Reagenti	μ l per 1 campione
LightCycler 480 Master Mix (2X)	10
Primer ASFV-162/I2 F (20 pmol/ μ l)	0,4
Primer ASFV-162/V2 R (20 pmol/ μ l)	0,4
Sonda ASF-VP72P1 (10 pmol/ μ l)	0,4
Acqua demineralizzata sterile	6,8
Totale master mix	18
DNA	2 μl
Volume totale	20

- Distribuire la miscela di reazione (18 μ l), i campioni estratti da analizzare e i controlli (CE+, CE-, CA+, NTC, CA-) in tubini ottici o piastra in plastica ottica, chiudere con i tappi o con i film adesivi, caricare lo strumento di real-time PCR.
- Spinnare la piastra.
- Impostare il file di corsa come descritto nel MOD.Q.250 e riportare il numero di accettazione, il numero progressivo del campione o dei campioni come da MOD.Q.643. Impostare le condizioni di corsa secondo il seguente profilo termico:

Condizioni di corsa della real-time PCR UPL (metodica A e metodica B)

		Denaturazione	Annealing/Estensione
Temperatura	95° C	95°C	60°C
Tempo	5 min.	10 sec.	30 sec.
Cicli	1 ciclo	45 cicli	
Volume	20 µl		

- Effettuare la collezione della fluorescenza nel canale del FAM sia per la probe UPL/TaqMan ASF, sia per la probe β -Act alla fine di ogni ciclo di reazione, durante la fase di annealing.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 20 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

• Lettura della prova

- Al termine della reazione, selezionare l'immagine della piastra sullo schermo del computer annesso allo strumento di real-time PCR e analizzarla con la funzione "Analysis/Analyze".
- Elaborare i risultati posizionando la threshold/soglia sul punto di flesso della curva rappresentante l'incremento di segnale fluorescente registrato dalla macchina e corrispondente, quindi, all'inizio della fase esponenziale di amplificazione secondo quanto riportato nel MOD.Q.250. Questa operazione deve essere eseguita sia per la sonda UPL/TaqMan ASF che per la sonda β -act.
- In seguito alla lettura i dati prodotti dalla corsa di real-time PCR sono salvati in cartelle protette da password sul PC dedicato allo strumento.

• Criteri di accettabilità dei risultati

La seduta è **valida** ed i risultati possono essere elaborati qualora:

- il controllo positivo di amplificazione (**CA+**) ha un valore medio di **Ct < 40 cicli**, per **sonda ASF**;
 - il controllo positivo di estrazione (**CE+**) ha un valore medio di **Ct 32 $\pm$ 2 cicli** per la **sonda ASF** e <40 cicli per la **sonda β -act** quando amplificata, con incremento regolare della fluorescenza (curve di amplificazione);
 - i controlli negativi **CA-** ed **NTC** hanno un valore medio di **Ct $\geq$ 45 cicli** per la sonda **sonda ASF**, con assenza di incremento regolare della fluorescenza e, quindi, delle curve di amplificazione;
 - il controllo negativo di estrazione (**CE-**) ha un valore medio di **Ct $\geq$ 45 cicli** per la **sonda ASF** e un Ct medio **< 40 cicli** per la **sonda β -act** quando amplificata;
 - tutti i campioni in esame dovranno mostrare un valore medio di **Ct < 40** cicli per la **sonda β -act** quando amplificata, con incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione);
- Nel caso dei **CE+** e **CA+**, è accettabile che questi abbiano un valore medio di **Ct $\geq$ 40 cicli** per la **sonda β -act** quando amplificata, a patto che contestualmente essi si dimostrino positivi al target specifico (**sonda ASF**).

La prova deve essere ripetuta nel caso in cui non siano rispettati i criteri di accettabilità.

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

• Modalità di espressione del risultato

In base all'elaborazione dei risultati:

- I campioni con **Ct medio < 40 cicli** sono da considerarsi **positivi** per il virus della Peste Suina Africana e refertati come **positivi** per il virus della Peste Suina Africana.
- I campioni con **Ct medio $\geq$ 38 e < 40** cicli sono da considerarsi **positivi** per il virus della Peste Suina Africana e refertati come **positivi** per il virus della Peste Suina Africana.
- I campioni che presentano un valore medio di **Ct $\geq$ 40** sono da considerarsi **negativi** per il virus della Peste Suina Africana e refertati come **negativi** per il virus della Peste Suina Africana. Nel caso in cui informazioni epidemiologiche correlate

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 21 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

oppure eventuali risultati sierologici positivi suggeriscano la possibilità di infezione da Peste Suina Africana, l'analisi deve essere ripetuta per confermare il risultato negativo.

9.1. Validazione del metodo di prova ed incertezza di misura

I parametri di validazione del metodo ottenuti secondo quanto descritto nella PRQ.013 sono riportati nel dossier di validazione (DV) residente presso l'articolazione organizzativa.

10. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova viene redatto secondo la PRQ.012 "Accettazione e Refertazione".

11. ARCHIVIAZIONE

Le modalità di archiviazione dei documenti sono riportate nella PRT.PGCHIM.022 "Gestione dei campioni e dei relativi documenti".

12. RESPONSABILITA'

Il Responsabile del Laboratorio o un suo delegato ha la responsabilità di:

- garantire la corretta applicazione della presente procedura
- affidare l'esecuzione della presente procedura a personale opportunamente addestrato
- controllare e verificare la correttezza dei risultati.

Il personale incaricato di eseguire la presente procedura ha la responsabilità della sua corretta esecuzione.

13. ALLEGATI

Allegato A – scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Tampone fosfato di base (PBS) pH 7,2 (1X).

Allegato B - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Oligonucleotidi/primer stock 100 pmol/μl.

Allegato C - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Oligonucleotidi/primer stock/soluzione di lavoro 20/30 pmol/μl.

Allegato D - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Sonda TaqMan stock/soluzione di lavoro 10 pmol/μl.

Allegato E - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Soluzione di Ipoclorito di sodio allo 0,4%.

Allegato F - scheda di preparazione della soluzione di lavoro – Etanolo 70%.

Allegato G – Soluzione Virkon Rely+On 1%.

Allegato H - Soluzione stock Penicillina 10.000 UI/ml (100X).

Allegato I - Soluzione stock Streptomicina 10 mgr/ml (100X).

Allegato L - Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 1,5 M (10X).

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 22 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato M - Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 0,15 M (1X) antibiotato (Streptomicina 100 microgrammi/ml + Penicillina 100 UI/ml).

Allegato N - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Tampone fosfato di base (PBS) pH 7,4 (1X) ottenuto con PBS tablets

ISTITUTO ZOOFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 23 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato A - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Tampone di fosfato di base (PBS) 1x										
Modalità di preparazione officinale PBS 0,15M pH 7,2-7,4 <table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr><td>NaCl</td><td>g 8</td></tr> <tr><td>KCl</td><td>g 0,20</td></tr> <tr><td>Na₂ HPO₄ 2H₂O</td><td>g 1,42</td></tr> <tr><td>KH₂PO₄</td><td>g 0,20</td></tr> <tr><td>Acqua distillata q.b. a</td><td>ml 1000</td></tr> </table> Sciogliere tutti i componenti in 800 ml di acqua demineralizzata, aggiustare il pH a 7.2-7,4, portare a volume e sterilizzare mediante apparato filtrante con filtro da 0,2 µm.	NaCl	g 8	KCl	g 0,20	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	g 1,42	KH ₂ PO ₄	g 0,20	Acqua distillata q.b. a	ml 1000
NaCl	g 8									
KCl	g 0,20									
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	g 1,42									
KH ₂ PO ₄	g 0,20									
Acqua distillata q.b. a	ml 1000									
Conservazione Temperatura ambiente										
Scadenza 6 mesi										
Precauzioni tecniche e di sicurezza N.A.										

Allegato B - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Oligonucleotidi/primer stock 100pmol/µl
Modalità di preparazione officinale: In base alle nmoli indicate dalla ditta produttrice, i primers liofilizzati vengono ricostituiti con acqua demineralizzata sterile in modo da ottenere una soluzione stock di 100 pmol/µl e dispensare in aliquote.
Conservazione -20°C
Scadenza 5 anni
Precauzioni tecniche e di sicurezza N.A.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 24 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato C - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Oligonucleotidi/primer stock/soluzione di lavoro 20 pmol/μl
Modalità di preparazione officinale: Diluire la soluzione stock 100pmol/μl con acqua demineralizzata sterile in modo da ottenere una soluzione di lavoro di 20 o 30 pmol/μl che può essere aliquotata.
Conservazione -20°C
Scadenza 5 anni
Precauzioni tecniche e di sicurezza N.A.

Allegato D - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Sonda UPL/TAQMAN stock/soluzione di lavoro 10 pmol/μl
Modalità di preparazione officinale: Ricostituire con acqua demineralizzata sterile la sonda UPL/TaqMan liofilizzata in modo da ottenere una soluzione stock/soluzione di lavoro di 10 pmol/μl, e dispensare in aliquote.
Conservazione -20°C
Scadenza 5 anni
Precauzioni tecniche e di sicurezza Conservare al riparo dalla luce

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 25 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato E - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Soluzione di Ipoclorito di sodio al 0,4%
Modalità di preparazione officinale: Preparare 1 litro di soluzione di Ipoclorito di sodio al 0,4% verificando la concentrazione iniziale di reagente (Ipoclorito di sodio) fornito dalla ditta produttrice e diluire secondo la formula $C1V1=C2V2$. Avere cura di prelevare il reagente solo da confezioni di reagente aperte di recente.
Conservazione Temperatura ambiente
Scadenza Preparare al momento dell'uso
Precauzioni tecniche e di sicurezza Conservare al riparo dalla luce

Allegato F - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Etanolo 70%
Modalità di preparazione officinale: per 1L di soluzione, prelevare 700 ml di etanolo assoluto e porlo in un cilindro graduato, aggiungere 300 ml di H ₂ O _{dd} , miscelare bene.
Conservazione Temperatura ambiente
Scadenza 12 mesi
Precauzioni tecniche e di sicurezza Liquido infiammabile, può provocare irritazione oculare. Indossare DPI idonei.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 26 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato G - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Soluzione Virkon Rely+On 1%
Modalità di preparazione officinale: prelevare 10 gr di Virkon in polvere sotto cappa chimica e porlo in una beuta con un 1 litro di di H ₂ Odd, miscelare accuratamente. Chiudere con parafilm.
Conservazione Temperatura ambiente
Scadenza 2-3 gg.
Precauzioni tecniche e di sicurezza NA

Allegato H - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Soluzione stock Penicillina 100X
Modalità di preparazione officinale: Sciogliere la penicillina G sodica in acqua demineralizzata alla concentrazione di 10.000 U.I. per ml. Sterilizzare mediante filtrazione con filtro da 0,2 µm e suddividere in aliquote da 5 ml. Impiegare alla concentrazione dell'1% (v/v) 100UI/ml.
Conservazione: -20°C
Scadenza: 6 mesi
Precauzioni tecniche e di sicurezza: N.A.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 27 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato I - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Soluzione stock Streptomicina 100X
Modalità di preparazione officinale: Sciogliere la Streptomicina solfato in acqua demineralizzata alla concentrazione di 10 mg/ml. Sterilizzare mediante filtrazione con filtro da 0,2 µm e suddividere in aliquote da 5 ml. Impiegare alla concentrazione dell'1% (v/v) 100µg/ml.
Conservazione: -20°C
Scadenza: 6 mesi
Precauzioni tecniche e di sicurezza: N.A.

Allegato L - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione	
Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 1,5 M (10X).	
Modalità di preparazione officinale:	
PBS 10X 1,5M pH 7,2-7,4	
NaCl	g 80
KCl	g 2
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	g 14,2
KH ₂ PO ₄	g 2
Acqua distillata q.b. a	ml 1000
Sciogliere tutti i componenti in 800 ml di acqua, aggiustare il pH a 7,2 e successivamente portare a volume con acqua.	
Conservazione:	
Temperatura ambiente	
Scadenza:	
12 mesi	
Precauzioni tecniche e di sicurezza:	
N.A.	

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.LNRPS2.007 Rev.005 Pag. 28 di 28
REAL-TIME PCR PSA UPL		

Allegato M - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 0,15 M (1X) antibiotato (Streptomicina 100 microgrammi/ml + Penicillina 100 UI/ml)
Modalità di preparazione officinale: Addizionare al PBS (1X): • streptomicina alla concentrazione finale di 100 µg/ml • penicillina alla concentrazione finale 100 UI/ml e sterilizzare mediante apparato filtrante con filtro da 0,2 µm.
Conservazione: +5°C
Scadenza: 1 mese
Precauzioni tecniche e di sicurezza: N.A

Allegato N - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Tampone fosfato di base (PBS) pH 7,4 (1X) ottenuto con PBS tablets
Modalità di preparazione officinale PBS NaCl 140 mM, tampone fosfato 10 mM e KCl 3 mM, pH 7,4 PBS tablet 1 pasticca Acqua deionizzata ml 1000 Sciogliere 1 pasticca di PBS in 1000 ml di acqua deionizzata e sterilizzare mediante apparato filtrante con filtro da 0,2 µm.
Conservazione Temperatura ambiente
Scadenza 6 mesi
Precauzioni tecniche e di sicurezza N.A.