

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Pag. 1 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

**IDENTIFICAZIONE VIRUS PESTE SUINA CLASSICA (PSC) MEDIANTE
REAL-TIME RT-PCR".
[WOAH MANUAL FOR TERRESTRIAL ANIMALS VERS. 2022]**

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
INSERITA NUOVA MATRICE NEL CAMPO DI APPLICAZIONE. 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
GIAMMARIOLI MONICA	FELIZIANI FRANCESCO	CAPUCCELLA MARINELLA	PEZZOTTI GIOVANNI	30/05/2025	009

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 2 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

ELENCO REVISIONI PRECEDENTI

REVISIONE NUMERO	DATA	MOTIVO DELLA REVISIONE
000	24.12.2008	Non applicabile
001	30.07.2013	Modificato il format. Modificato il titolo. Modificati i riferimenti.
002	28.05.2018	Modificato il format, aggiornate le abbreviazioni e termini, aggiornate le procedure collegate, aggiornata la modulistica collegata, le modalità operative, inserite le soluzioni di lavoro
003	16.01.2020	Adeguamento manuale OIE
004	19/02/2021	Modificati il controllo di processo interno e la master mix di amplificazione.
005	13/10/2021	Adeguate il riferimento normativo, adeguato il format, inserita estrazione automatizzata.
006	12/04/2023	Aggiornamento normativo, precisati i riferimenti alle procedure di biosicurezza
007	09/01/2025	Aggiornamento normativo, inserimento novi reagenti, soluzioni di lavoro e strumentazione.
008	24/03/2025	Correzione errore formale.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 3 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

INDICE

1. SCOPO.....	4
2. CAMPO DI APPLICAZIONE.....	4
3. TERMINI, DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI.....	4
4. RIFERIMENTI.....	6
5. PRINCIPIO	7
6. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PROCEDIMENTO	8
7. REAZIONI.....	8
8. MODALITÀ OPERATIVE.....	8
9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI.....	19
10. RAPPORTO DI PROVA.....	19
11. ARCHIVIAZIONE	19
12. RESPONSABILITA'	19
13. ALLEGATI.....	20

ISTITUTO ZOOFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 4 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

1. SCOPO

La presente procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per l'identificazione rapida e la conferma del virus della Peste Suina Classica (PSC) mediante real-time RT-PCR.

Definisce inoltre le relative responsabilità del personale coinvolto.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura si applica a RNA estratto da campioni di sangue con EDTA, siero, tessuti e/o omogenati d'organi di suidi e colture cellulari infette e sull'acido nucleico RNA. 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 Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da *Pestivirus* e da *Asfivirus*.

S9PESSUI: Laboratorio Nazionale di Referenza Pesti Suine.

EURL: European Reference Laboratory for Classical Swine Fever.

PSC-CSF: Peste Suina Classica, Classical Swine Fever.

RNA: acido ribonucleico.

cDNA: acido deossiribonucleico monocatenario la cui sequenza nucleotidica è complementare a quella dell'RNA da cui è stato copiato.

r.p.m.: rotazioni per minuto.

UI: Unità Internazionali.

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, RNA del virus della Peste Suina Classica (PSC) 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 Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e Asfivirus (CEREP) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Umbria e delle Marche Togo Rosati.

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

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 Classica (PSC) appartenente a uno dei genotipi fino ad ora conosciuti, prodotti "*in house*" dal Centro di Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e 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 Classica (PSC), prodotti "*in house*" dal Centro di Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da Pestivirus e Asfivirus (CEREP) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Umbria e delle Marche Togo Rosati.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 5 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

NTC: no template control, controllo di reazione negativo, contenente solo la mix di reazione.

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.

RT- PCR "one step": metodica che prevede l'utilizzo di una combinazione dei due enzimi, trascrittasi inversa e polimerasi, in un'unica miscela di reazione per effettuare la retrotrascrizione e l'amplificazione di una sequenza bersaglio.

β Actina: beta-actina endogena.

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: molecola fluorescente all'estremità 5' della sonda responsabile dell'emissione della fluorescenza.

FAM/VIC: 2-cloro-7-felina-1,4-dicloro-6-carboxil-fluoresceina. Fluorocromo in posizione 5' della sonda utilizzato come reporter nelle sonde (reporter).

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

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

Foglio di lavoro: foglio elaborato dal Laboratorio Nazionale 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.

ISTITUTO ZOOFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 6 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

4. RIFERIMENTI

- **Regolamenti tecnici e Norme collegate**

- WOAH 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 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"
 - 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.126 "Foglio di lavoro identificazione virus Peste Suina Classica (PSC) mediante real-time RT-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"

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 7 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

• Altri riferimenti

- Manual of Diagnostic Tests for Detection of CSF EU Reference Laboratory for CSF (CRL), University of Veterinary Medicine Hannover, 30559 Hannover, Germany. Published in April 2021; updated in December 2024.
- Hoffman B., Beer M., Schelp C., Schirrmeier H., Depner K. (2005). Validation of a Real Time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of Classical Swine Fever. J. Virol. Methods, 130, 36-44.
- 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.
- Istruzioni d'uso (Handbook) del kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).
- Istruzioni d'uso del Kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems).
- QIAsymphony SP/AS User Manual.
- QIAsymphony DSP Virus/Pathogen MINI/MIDI Kit User Manual.
- 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.PGCEREP.008: "Identificazione virus Peste Suina Classica (PSC) mediante real-time RT-PCR".

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 (RNA) presente nel campione da analizzare in relazione al gene target di interesse.

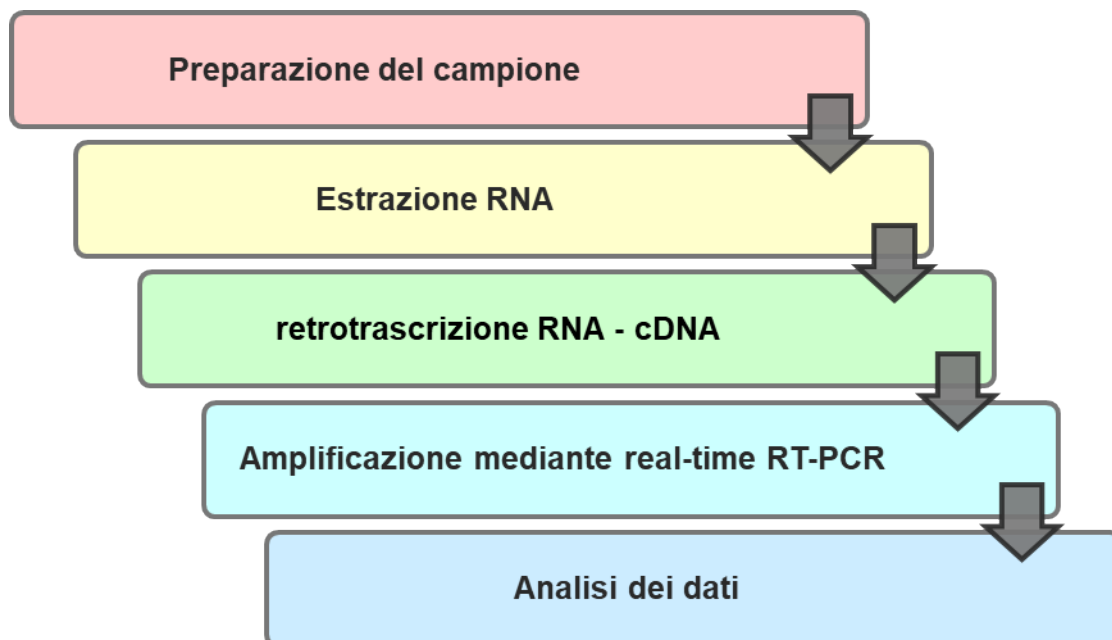
La tecnologia dello strumento è legata alla fluorescenza, in quanto prevede l'uso di sonde ad ibridazione di tipo TaqMan, sequenza specifiche. Per rilevare i prodotti di PCR l'incremento di fluorescenza viene monitorato dallo strumento di real-time PCR e analizzato poi dal software dello strumento.

I primers e la probe utilizzati nella real-time RT-PCR descritta amplificano un frammento di circa 90 bp, dal nucleotide 100 al nucleotide 192 dello stipite di riferimento Alfort/187 (GenBank Accession no. X87939), in grado di identificare tutti i genotipi fino ad ora identificati.

Al fine di monitorare tutte le fasi del processo e l'amplificabilità dell'RNA purificato, in fase di real-time RT-PCR viene amplificato anche il gene della beta-actina endogena su tutti i campioni e i controlli.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 8 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

6. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PROCEDIMENTO



7. REAZIONI

Non applicabile

8. MODALITÀ OPERATIVE

8.1. Condizioni ambientali

Non sono richieste specifiche condizioni ambientali. E' 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.001₁ e nella POB.006.

8.2. 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.

8.3. Materiali

- Puntali sterili RNase-free con filtro per micropipette
- Pipette graduate sterili monouso da 1 ml/ 2ml/ 5ml/ 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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 9 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

- 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
 - QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit e QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit.
- **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™.

8.4. Apparecchiature

- Agitatore a vibrazione (vortex)
- Cappa chimica
- Cappa a flusso laminare
- Cappetta per PCR
- Congelatore -20°C (+5°C)
- Congelatore -75°C ±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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 10 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

- 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.

8.5. Reagenti e Soluzioni di lavoro

8.5.1. Reagenti e materiali forniti dal kit di estrazione manuale (QIAamp Viral RNA Mini Kit– Spin Protocol -QIAGEN)

- Buffer AVL Viral lysis
- Carrier RNA lyophilized
- Buffer AW1 Wash buffer 1 concentrate
- Buffer AW2 Wash buffer 2 concentrate
- QIAamp Mini Spin Column
- Buffer AVE Elution Buffer
- Collection Tubes (2 ml).

8.5.2. Reagenti e materiali forniti dal kit di 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)

8.5.3. Reagenti e materiali non forniti dal kit QIAasympphony 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

8.5.4. 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.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 11 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

8.5.5. 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)
- Ipoclorito di sodio al 4/4,5%
- Etanolo 100% (> 99%)
- Oligonucleotidi /primers sintetici liofilizzati (sequenza riportata in tabella 1)
- Probe o Sonda TaqMan liofilizzata (sequenza riportata in tabella 1)
- Buffer ATL (Qiagen)
- Buffer ACL (Qiagen)
- Proteinasi K (PK)
- Soluzione fisiologica
- H₂O demineralizzata sterile
- PBS tablets, EMD Millipore Corp., o prodotto equivalente

Tabella 1: Sequenza dei primers/probe utilizzati nella real-time RT-PCR per PSC

Gene target	Nome primer	Sequenza primer/probe
5'-NTR	CSF100-F	5'-ATG CCC AYA GTA GGA CTA GCA-3'
	CSF192-R	5'- CTA CTG ACG ACT GTC CTG TAC-3'
	CSF-P	5'-FAM-TGG CGA GCT CCC TGG GTG GTC TAA GT-TAMRA -3'
β-actina	ACT-F	5'-AGC GCA AGT ACT CCG TGT G-3'
	ACT-R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T-3
	ACT-P	5'-VIC TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-TAMRA-3'

8.5.6. Soluzioni di lavoro

- Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 (1X)
- Oligonucleotidi/primer stock 100 pmol/μl
- Oligonucleotidi/primer soluzione di lavoro 30 pmol/μl
- Sonda TAQMAN stock/soluzione di lavoro 10 pmol/μl
- Soluzione di Etanolo al 70%
- Tampone fosfato di base (PBS) ottenuto da tablets per PBS, pH 7,4 (1X)
- Soluzione di Ipoclorito di sodio allo 0,4%
- Soluzione stock Penicillina 10.000 UI/ml (100X)
- Soluzione stock Streptomina 10 mgr/ml (100X)
- Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 1,5 M (10X)
- Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 0,15 M (1X) antibiotato (Streptomina 100 microgrammi/ml + Penicillina 100 UI/ml)

Per tutte le soluzioni di lavoro impiegate nella fase di estrazione si rimanda alle istruzioni dei kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) e QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini e Midi Kit (Qiagen), MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystem™).

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 12 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

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

8.6. Materiali di Riferimento

- RNA del virus della Peste Suina Classica stipite di riferimento Alfort 187 estratto da coltura cellulare infetta, prodotto "*in house*" dal CEREP (CA+).
- Siero, tessuti e/o omogenati d'organo infetti con il virus della Peste Suina Classica (PSC) prodotti "*in house*" dal CEREP (CE+).
- Siero, tessuti e/o omogenati d'organo negativi al virus della Peste Suina Classica (PSC) prodotti "*in house*" dal CEREP (CE-).

I materiali di riferimento sono prodotti secondo quanto descritto nella PRT.LNRPS2. 001. Essi possono essere usati come controlli di estrazione (CE) in associazione al controllo di processo interno (β actina).

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

8.7. 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.

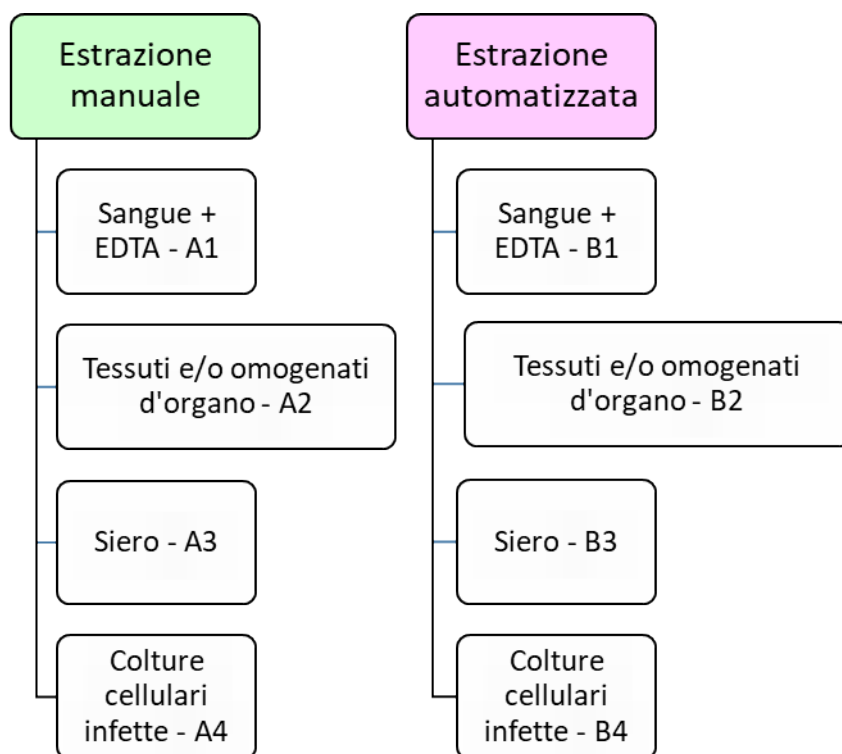
8.8. Preparazione del campione

All'inizio di ogni sessione di lavoro:

- compilare il MOD.Q.126: 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.126. 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.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 13 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

Figura 1: Elenco matrici



- **Sangue + EDTA**

A1 - Prelevare 140 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**

A2 - Prelevare 140 µl di tessuto e/o omogenato d'organo, 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.

- **Siero**

A3 - Prelevare 140 µl di siero, porlo in una provetta tipo eppendorf numerata, ed estrarre secondo il protocollo di estrazione manuale.

B3 - Prelevare il volume necessario 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.

- **Colture cellulari infette e non**

A4 - Prelevare 140 µl di coltura cellulare infetta/ciolisato, porlo in una provetta tipo eppendorf numerata, ed estrarre secondo il protocollo di estrazione manuale.

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.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 14 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

8.9. 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-).

Al termine di ogni sessione di estrazione viene eseguita una decontaminazione dell'area di lavoro secondo quanto descritto dalla PRT.ANMICALI.035 e POB.006.

8.9.1. Estrazione manuale dell'RNA virale secondo il QIAamp Viral RNA Mini Kit – Spin Protocol (QIAGEN)

Equilibrare i campioni da analizzare a temperatura ambiente. Controllare che i buffer AW1 ed AW2 siano stati preparati come indicato dalle istruzioni del QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). Controllare che il carrier RNA sia stato ricostituito in accordo alle istruzioni del QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).

- Pipettare 560 µl di buffer AVL in una provetta tipo eppendorf da 1,5 ml opportunamente numerata per il numero di campioni in esame e per i controlli di estrazione.
- Aggiungere 5,6 µl di carrier.
- Aggiungere 140 µl di ogni campione in esame e 140 µl di controllo di estrazione (CE+/CE-), nelle rispettive eppendorf, mescolare vortexando per 15 secondi.
- Incubare a temperatura ambiente (15°-25°C) per 10 minuti.
- Spinnare brevemente le eppendorf per eliminare le gocce dal tappo.
- Aggiungere 560 µl di etanolo assoluto al campione, vortexare per 10 secondi e spinnare brevemente per rimuovere le gocce dal tappo.
- Caricare 630 µl della soluzione così ottenuta in colonna (QIAamp Mini Spin Column) preventivamente inserita in un tubo di raccolta, chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 6.000 g. Scartare il filtrato e porre la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.
- Con attenzione aprire il tappo della colonnina, caricare la soluzione rimasta e ripetere le stesse operazioni del punto precedente.
- Con attenzione aprire la colonnina ed aggiungere 500 µl di buffer AW1, chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 6.000 g. Scartare il filtrato e porre la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.
- Con attenzione aprire la colonnina ed aggiungere 500 µl di buffer AW2, chiudere il tappo e centrifugare per 3 minuti a 20.000 g. Scartare il filtrato e porre la colonnina in un nuovo tubo di raccolta.
- Centrifugare per 1 minuto a alla massima velocità. Scartare il filtrato e porre la colonnina in una eppendorf da 1,5 ml.
- Con attenzione aprire la colonnina ed aggiungere 50 µl di buffer AVE per l'eluizione. Chiudere il tappo, incubare a temperatura ambiente per 1 minuto quindi centrifugare per 1 minuto a 6.000 g.
- Recuperare l'eluato ed eliminare la colonnina. Stoccare l' RNA estratto (50µl) a -75°C fino al momento dell'amplificazione.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 15 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

8.9.2. 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.

8.9.3. Fase di inattivazione/lisi del campione

- Controllare che il 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 ZOOFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 16 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

- 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.

8.9.4. 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 King Fisher Apex 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 1/2 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.
- In una deep weel 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.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 17 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

- 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.

8.9.5. Amplificazione dell'RNA del virus della PSC mediante real-time RT-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 cappetta 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 al 4% le superfici di appoggio ed accendere la lampada UV per circa 20-30 minuti.
- Allestire una miscela di reazione unica preparata 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.

Miscela di reazione della real-time PCR

Reagenti	µl per 1 campione
Master Mix (4X)	5,0
Primer CSF 100-F 30 pmol/µl	0,52
Primer CSF 192-R 30 pmol/µl	0,52
Probe CSFP 10 pmol/µl	0,4
Primer Act-F 30 pmol/µl	0,13
Primer Act-R 30 pmol/µl	0,13
Probe Act-P 10 pmol/µl	0,2
Acqua demineralizzata sterile	9,1
Totale master mix	16
RNA	4 µl
Volume totale	20

- Distribuire la miscela di reazione (20 µl), 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.126.
- Impostare le condizioni di corsa secondo il seguente profilo termico:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 18 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

Condizioni di corsa della real-time PCR

			Denaturazione	Annealing/Estensione
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tempo	5 min.	20 sec.	3 sec.	30 sec.
Cicli	1 ciclo		42 cicli	
Volume	20 µl			

- Effettuare la collezione della fluorescenza nel canale del FAM per la probe CSF e nel canale del VIC per la probe Act alla fine di ogni ciclo di reazione, durante la fase di annealing.

8.10. 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 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 FAM CSF che per la sonda VIC Act. In seguito alla lettura i dati prodotti dalla corsa di real-time RT-PCR sono salvati in cartelle protette da password sul PC dedicato allo strumento.

8.11. 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 < 42 cicli, sia per la sonda marcata FAM (sonda CSF) sia per la sonda marcata VIC (sonda Act), con incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione)
- il controllo positivo di estrazione (CE+) ha un valore medio di Ct < 42 cicli sia per la sonda marcata FAM (sonda CSF) sia per la sonda marcata VIC (sonda Act), con incremento regolare della fluorescenza (curve di amplificazione)
- i controlli negativi CA- ed NTC hanno un valore medio di Ct ≥ 42 cicli sia per la sonda marcata FAM (sonda CSF) sia per la sonda marcata VIC (sonda Act), 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 ≥ 42 cicli per la sonda marcata FAM (sonda CSF) e un Ct medio < 42 cicli per la sonda marcata VIC (sonda Act)
- inoltre tutti i campioni in esame dovranno mostrare un valore medio di Ct < 42 cicli per la sonda marcata VIC (sonda Act), con incremento regolare della fluorescenza (curva di amplificazione).

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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 19 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Modalità di espressione del risultato

In base all'elaborazione dei risultati:

- I campioni con Ct medio < 42 cicli per la sonda marcata FAM (sonda CSF) sono da considerarsi positivi per il virus PSC e validati come positivi per Peste Suina Classica
- I campioni con Ct medio $\geq$ 42 cicli per la sonda marcata FAM (sonda CSF) sono da considerarsi negativi per il virus PSC e validati come negativi per Peste Suina Classica
- I campioni che presentano una curva di amplificazione irregolare si considerano aspecifici e pertanto negativi.

9.1. Validazione del metodo di prova ed incertezza di misura

I parametri di validazione del metodo sono riportati nel Dossier di Validazione 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.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 20 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

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 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 – Etanolo 70%.

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

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

Allegato H - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Soluzione stock Penicillina 10.000 UI/ml (100X)

Allegato I - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Soluzione stock Streptomicina 10 mgr/ml (100X)

Allegato L - scheda di preparazione della soluzione di lavoro - Tampone fosfati di base (PBS) pH 7,2 1,5 M (10X)

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

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 21 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

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 1,78</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 1,78	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 1,78									
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 (+5, -20)
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.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 22 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

Allegato C - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Oligonucleotidi/primer stock/soluzione di lavoro 30 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 30 pmol/μl che può essere aliquotata.
Conservazione -20°C (+5, -20)
Scadenza 5 anni
Precauzioni tecniche e di sicurezza N.A.

Allegato D - SCHEDA DI PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI LAVORO

Nome della soluzione Sonda TAQMAN stock/soluzione di lavoro 10 pmol/μl
Modalità di preparazione officinale: Ricostituire con acqua demineralizzata sterile la sonda TaqMan liofilizzata in modo da ottenere una soluzione stock/soluzione di lavoro di 10 pmol/μl, e dispensare in aliquote.
Conservazione -20°C (+5, -20)
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.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 23 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

Allegato E - 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 Odd, miscelare bene.
Conservazione Temperatura ambiente
Scadenza 12 mesi
Precauzioni tecniche e di sicurezza Liquido infiammabile, può provocare irritazione oculare. Indossare DPI idonei.

Allegato F - 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.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006 PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO NORMATO	PRT.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 24 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

Allegato G - 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 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 (+5, -20)
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.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 25 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

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 (+5, -20)
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.PGCEREP.008 Rev.009 Pag. 26 di 26
REAL-TIME PCR PSC		

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 (±3)
Scadenza: 1 mese
Precauzioni tecniche e di sicurezza: N.A