

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Pag. 1 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

## RICERCA DEL GENE CTXA IN VIBRIO CHOLERAES MEDIANTE PCR

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.

<b>MOTIVO DELLA REVISIONE</b>
<b>NON APPLICABILE</b>

REDATTO DA	APPROVATO: Resp. Art. Org.	VERIFICATO QA	AUTORIZZATO PER IL DG	DATA	N. REVISIONE
LEONI FRANCESCA	LEONI FRANCESCA	CAPUCELLA MARINELLA	PEZZOTTI Giovanni	29/05/2024	000

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale dell'Umbria e delle Marche	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	PRT.S9MOLLAN.001  Rev.000  Pag. 2 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAE</i></b>		

### ELENCO REVISIONI PRECEDENTI

REVISIONE NUMERO	DATA	MOTIVO DELLA REVISIONE

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 3 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

## INDICE

1. SCOPO.....	4
2. CAMPO DI APPLICAZIONE.....	4
3. TERMINI, DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI .....	4
4. RIFERIMENTI.....	5
5. PRINCIPIO .....	6
6. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PROCEDIMENTO .....	6
7. REAZIONI.....	6
8. MODALITÀ OPERATIVE.....	6
9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI.....	15
10. RAPPORTO DI PROVA .....	15
11. ARCHIVIAZIONE .....	15
12. RESPONSABILITÀ' .....	15
13. ALLEGATI.....	15

<b>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE</b>	<b>MOD.QAS.030 Rev. 006</b> <b>PROCEDURA OPERATIVA TECNICA</b> <b>METODO INTERNO</b>	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b> Rev.000 Pag. 4 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

## 1. SCOPO

La presente procedura descrive le modalità operative per la ricerca del gene *ctxA* della tossina colerica CTX in *Vibrio cholerae*. La ricerca è effettuata mediante isolamento su terreno solido non selettivo, estrazione del DNA da colonia e ricerca mediante PCR della presenza/assenza del gene *ctxA*.

Definisce inoltre le relative responsabilità del personale coinvolto.

## 2. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura viene applicata ad isolati batterici di *V. cholerae*, precedentemente identificati mediante la procedura PRT.LNRMB8.004, per determinare la presenza/assenza del gene *ctxA* mediante PCR.

La procedura operativa viene inoltre applicata ad isolati batterici di *V. cholerae* ricevuti da altri laboratori per determinare la presenza/assenza del gene *ctxA*.

## 3. TERMINI, DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI

**bp:** paia di basi. Unità di misura per definire la grandezza di una sequenza di DNA.

**CA+:** Controllo positivo di PCR. Reazione contenente il DNA target, utilizzata per dimostrare l'avvenuta amplificazione della sequenza bersaglio.

**CA-:** Controllo negativo di PCR. Reazione contenente tutti i reagenti di amplificazione eccetto il DNA, sostituito da acqua per biologia molecolare (nucleasi free).

**CE-:** Controllo negativo di estrazione. Controllo sottoposto agli stessi trattamenti dei campioni da testare, nel quale il campione è sostituito da acqua nucleasi free.

**CTX:** tossina colerica.

**ctxA:** gene codificante la tossina colerica.

**DNA:** acido desossiribonucleico.

**dNTPs:** desosinucleotidi trifosfati (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) necessari nella PCR alla polimerizzazione della sequenza di DNA.

**DNA Marker (MK):** miscela di frammenti di DNA a grandezza nota, che costituiscono una scala di riferimento di peso molecolare.

**Primer:** oligonucleotide di grandezza definita e sequenza complementare ad un segmento di una sequenza di DNA rilevante dal punto di vista analitico.

**PCR:** reazione a catena della polimerasi. Reazione enzimatica che a partire da uno stampo di DNA permette l'amplificazione *in vitro* di una sequenza bersaglio, delimitata dalle regioni degli oligonucleotidi primer, utilizzando una DNA polimerasi DNA-dipendente termoresistente.

**TAE (Tris Acetato EDTA):** tampone per la separazione elettroforetica dei frammenti di DNA.

**Taqpol:** DNA polimerasi DNA-dipendente di *Thermus aquaticus*.

**U:** unità.

**UV:** raggi ultravioletti.

**V:** volts.

<b>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE</b>	<b>MOD.QAS.030 Rev. 006</b> <b>PROCEDURA OPERATIVA TECNICA</b> <b>METODO INTERNO</b>	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b> Rev.000 Pag. 5 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

#### 4. RIFERIMENTI

- **Regolamenti tecnici e norme collegate**
  - UNI EN ISO 22174 “Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti – Requisiti generali e definizioni”.
  - UNI EN ISO 7218 “Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche”.
- **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 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”
  - PRT.S.002: “Centrifuga - Disposizioni per l'utilizzo in sicurezza”
  - PRT.PGCHIM.022: “Gestione dei campioni e relativi documenti”
  - PRQ.QAS.018: “Gestione delle non conformità e delle azioni correttive e preventive”
  - PRT.PGTSE.010: “Controllo in servizio temperatura termoblocco – thermomixer – incubatore a secco”
  - PRQ.QAS.005: “Gestione e smaltimento dei rifiuti”
  - PRT.PGTECO.004: “Modalità di produzione dei terreni colturali”
  - PRT.PGTECO.005: “Modalità di gestione dei terreni colturali”
  - PRT.ANMICALI.035 “Decontaminazione microbica dei laboratori”
  - PRT.LNRMB8.004: “*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* – Ricerca [ISO 21872-1:2017/AMD1:2023]”
  - PRT.PGMICALI.038: “Gestione dei ceppi microbici di riferimento”
  - IO.S5BIOTEC.001 “Organizzazione e modalità di decontaminazione di un laboratorio di biologia molecolare”
- **Modulistica collegata**
  - Mod.Q.873 “Quaderno di laboratorio PCR gene *ctxA* di *Vibrio cholerae*”.
- **Altri riferimenti**
  - Fields P.I., Popovic T., Wachsmuth K., Olsvik O. (1992). Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 6 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

- American cholera epidemic. J. Clin. Microbiol. 30(8):2118-2121. doi: 10.1128/jcm.30.8.2118-2121.1992.
- Rivera I. N. G., Chun J., Huq A., Sack R. B., Colwell R. R. (2001). Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2421-2429.
  - Ottaviani D., Medici L., Talevi G., Napoleoni M., Serratore P., Zavatta E., Bignami G., Masini L., Chierichetti S., Fisichella S., Leoni F. (2018). Molecular characterization and drug susceptibility of non-O1/O139 *V. cholerae* strains of seafood, environmental and clinical origin, Italy. Food Microbiol. 72:82-88. doi: 10.1016/j.fm.2017.11.011.
  - DV.PRT.S9MOLLAN.001: "Dossier di validazione ricerca del gene *ctxA* in *Vibrio cholerae* mediante PCR"

## 5. PRINCIPIO

Il metodo è basato sul principio dell'amplificazione specifica di una sequenza del DNA a partire da oligonucleotidi di sintesi complementari alle estremità della sequenza stessa, che funzionano da innesco per una reazione di polimerizzazione *in vitro* per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR).

## 6. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PROCEDIMENTO

La metodica si articola in 4 fasi successive:

- Crescita dell'isolato batterico
- Preparazione del DNA da utilizzare come stampo per la reazione di PCR
- PCR per la ricerca del gene *ctxA*
- Analisi dei prodotti di PCR mediante elettroforesi orizzontale effettuata in gel di agarosio

Nel caso di isolati batterici identificati come *V. cholerae* mediante PRT.LNRMB8.004, utilizzare il DNA preparato secondo PRT.LNRMB8.004 per effettuare la PCR per la ricerca del gene *ctxA*.

## 7. REAZIONI

Non applicabile.

## 8. MODALITÀ OPERATIVE

### 8.1 Condizioni ambientali

- Le condizioni ambientali, nelle aree destinate all'esecuzione di prove soggette a particolari vincoli sono monitorate secondo quanto indicato nella UNI EN ISO 7218 e identificate nel Documento Organizzativo dell'Articolazione Organizzativa.

<b>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE</b>	<b>MOD.QAS.030 Rev. 006</b> <b>PROCEDURA OPERATIVA TECNICA</b> <b>METODO INTERNO</b>	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b> Rev.000 Pag. 7 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i></b>		

- I locali ed i banconi ove vengono svolte particolari attività critiche sono inoltre sottoposti a controllo microbiologico secondo quanto indicato nella PRT.ANMICALI.035.
- Le aree per le attività PRE-PCR e POST-PCR sono separate l'una dall'altra al fine di ridurre il rischio di contaminazioni crociate, secondo quanto indicato nella IO.S5BIOTEC.001.
- Al termine di ogni sessione di lavoro, le superfici di lavoro, la strumentazione e i materiali non monouso utilizzati dove vengono svolte particolari attività critiche sono sottoposte a decontaminazione da acidi nucleici secondo quanto previsto nella IO.S5BIOTEC.001. La decontaminazione straordinaria da acidi nucleici degli ambienti, superfici e strumentazione nelle aree per le attività PRE-PCR e POST-PCR è effettuata secondo quanto riportato nella IO.S5BIOTEC.001.

## 8.2 Misure di sicurezza

- Nell'esecuzione della presente procedura applicare i livelli di contenimento previsti nella PRQ.S.001 e PRQ.S.002 e le modalità descritte nella PRT.PGCHIM.022.
- Nell'utilizzo della microcentrifuga fare riferimento alle disposizioni per l'utilizzo in sicurezza delle centrifughe riportate nella PRT.S.002.
- Per lo smaltimento dei campioni analizzati e di tutto il materiale utilizzato seguire quanto descritto nella PRQ.QAS.005.

## 8.3 Materiali

- Anse ed aghi sterili o sterilizzabili (le anse devono avere capacità di circa 1 µl)
- Beute in vetro da 250 ml
- Chiave USB
- Cilindri graduati da 100 o 200 ml
- Guanti monouso
- Livella a bolla
- Nastro adesivo di carta
- Parafilm
- Pettini per gel di elettroforesi orizzontale
- Pipette graduate sterili vari volumi
- Provette monouso sterili da 1.5-1.7 ml (nucleasi *free* per microcentrifuga)
- Provette monouso sterili da 0.5 o 0.2 ml per PCR
- Puntali sterili con filtro per micropipette graduate con volumi fra 1 µl e 1000 µl
- Spatole o cucchiae
- Supporti per provette da 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5-1.7 ml (autoclavabili)
- Varechina
- Vassoio per gel di elettroforesi orizzontale

<b>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale dell'Umbria e delle Marche</b>	<b>MOD.QAS.030 Rev. 006</b> <b>PROCEDURA OPERATIVA TECNICA</b> <b>METODO INTERNO</b>	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b> Rev.000 Pag. 8 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAE</i></b>		

#### 8.4 Apparecchiature

- Agitatore automatico (Vortex)
- Alimentatore per elettroforesi orizzontale
- Bilancia tecnica 0.01g
- Camera elettroforetica
- Cappa a flusso laminare
- Cappa chimica
- Congelatore -20°C (+ 5°C)
- Forno a microonde oppure agitatore magnetico riscaldato
- Frigorifero + 5°C ( $\pm$  3°C)
- Micropipette graduate per volumi fra 1  $\mu$ l e 1000  $\mu$ l
- Microcentrifuga per provette da 1,5-1,7 ml
- Pipettatore automatico
- Sistema di lettura UV e documentazione per gel elettroforesi
- Termociclatore
- Termostato 37°C  $\pm$  1 °C
- Thermomixer 95°C  $\pm$  2°C

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

Per il controllo in servizio del Thermomixer attenersi a quanto indicato nella PRT.PGTSE.010.

#### 8.5 Reagenti e soluzioni di lavoro

- Acqua nucleasi *free*
- Agarosio
- Cloruro di Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) in soluzione 25 mM (fornito con *Taq*DNA polimerasi)
- Colorante di caricamento (6X)
- DNA da ceppo di riferimento di *V. cholerae* caratterizzato per la presenza del gene *ctxA*
- DNA Marker di peso molecolare (100 bp DNA, soluzione pronta all'uso o preparata secondo specifiche del produttore)
- dNTPs 2,5 mM
- Colorante intercalante per acidi nucleici: GelRed Nucleic Acid stain concentrazione 10.000x in acqua, o Midori Green Advanced DNA stain o altro intercalante
- Primer PCR: soluzioni d'uso 20  $\mu$ M

<b>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE</b>	<b>MOD.QAS.030 Rev. 006</b> <b>PROCEDURA OPERATIVA TECNICA</b> <b>METODO INTERNO</b>	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b> Rev.000 Pag. 9 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i></b>		

Nome Primer	Sequenza	Target
<i>ctxA</i> 94F	5'-CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G-3'	<i>ctxA</i>
<i>ctxA</i> 614R	5'-CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC-3'	<i>ctxA</i>

- TAE (1X): soluzioni preparata prima dell'uso da soluzione stock di TAE 50X (Allegato A) o da reagente TAE soluzione stock (es. 10X)
- TAE soluzione stock (es. 10X)
- Tampone per PCR 5x (fornito con *Taq*DNA polimerasi)
- *Taq*-DNA polimerasi

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

Per le modalità di preparazione delle soluzioni di lavoro attenersi a quanto indicato nell'Allegato A.

## 8.6 Materiali di Riferimento

- *V. cholerae* ATCC 9459 (*biotipo Classico*)

Altro materiale di riferimento diverso da quello elencato potrebbe essere utilizzato, purché appartenente a *Vibrio cholerae* e avente il gene di virulenza *ctxA*.

Per la gestione dei materiali di riferimento attenersi a quanto indicato nella PRQ.010 e nella PRT.PGMICALI.038.

## 8.7 Terreni colturali

- Acqua demineralizzata sterile
- Agar Nutriente Salino (SNA)
- Trypticase soy agar salato con NaCl 3% (TSA-S)

Per la composizione dei terreni si rimanda alle specifiche schede tecniche consultabili sul sito Web dell'Istituto. I terreni sono preparati e gestiti in conformità a quanto descritto nelle PRT.PGTECO.004 e PRT.PGTECO.005.

Per l'utilizzo dei terreni attenersi alle indicazioni riportate nella UNI EN ISO 7218.

## 8.8 Modalità di gestione del campione

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.

I ceppi per la ricerca del gene *ctxA* vengono conservati a temperatura ambiente fino all'inizio dell'analisi.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 10 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

## 8.9 Modalità di esecuzione della procedura

Nel caso di isolati batterici identificati come *V. cholerae* mediante PRT.LNRMB8.004, utilizzare il DNA del ceppo e il CE- preparati secondo PRT.LNRMB8.004 per effettuare la PCR per la ricerca del gene *ctxA*.

### 8.9.1 Preparazione delle colture degli isolati batterici ricevuti in conferma da altri laboratori

Eseguire tutti i passaggi preliminari all'inattivazione dei germi nella cappa a flusso laminare verticale indossando guanti monouso.

Eseguire una semina per diluizione delle colonie da analizzare sulla superficie di piastre di agar nutriente salino o altro idoneo terreno (TSA-S), asciugate, in modo da consentire lo sviluppo di colonie ben isolate. Incubare le piastre inoculate a 37°C ± 1 °C per 24 h ± 3 h.

Eseguire le fasi successive indossando guanti monouso.

### 8.9.2 Preparazione della coltura del ceppo batterico di *V. cholerae* da utilizzare come CA+ per la ricerca del gene *ctxA*

Eseguire tutti i passaggi preliminari all'inattivazione dei germi nella cappa a flusso laminare verticale indossando guanti monouso.

Seminare, mediante ansa sterili o sterilizzabili, il ceppo batterico di riferimento di *V. cholerae* portatore del gene *ctxA* sulla superficie di una piastra di agar nutriente salino o altro idoneo terreno (TSA-S) asciugata, in modo da consentire lo sviluppo di colonie ben isolate. Incubare la piastra inoculata a 37 °C ± 1 °C per 24 h ± 3 h.

### 8.9.3 Estrazione del DNA

Lavorando nella cappa a flusso laminare nella zona adibita all'estrazione acidi nucleici:

- Accendere il thermomixer ed impostare la temperatura di 95 °C ± 2 °C.
- Identificare tante provette sterili da 1,5 - 1,7 ml per quante sono le colonie da analizzare, più una provetta per il controllo di estrazione negativo CE-.
- Dispensare in ogni provetta 500 µl di acqua nucleasi free.
- Nella cappa a flusso laminare verticale, con ansa sterile o sterilizzabile, preparare una sospensione batterica, ad eccezione del CE-, stemperando una colonia dall'agar nutriente salino.
- I campioni e il CE- vengono incubati nel thermomixer per 5 minuti ± 1 minuto a 95°C ± 2 °C.
- Centrifugare a 10.000 x g per 1 minuto.
- Trasferire il surnatante in una nuova provetta monouso sterile da 1,5 - 1,7 ml opportunamente identificata per la successiva PCR.

Conservare il DNA estratto in frigorifero (5°C ± 3°C) per una conservazione a breve termine (< 1 mese), oppure in congelatore (-20°C / + 5°C) per una conservazione

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 11 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

prolungata.

**N.B.:** Eseguire i passaggi preliminari all'inattivazione dei germi nella cappa a flusso laminare verticale indossando guanti monouso.

Il DNA da ceppo batterico di riferimento di *V. cholerae* contenente il gene *ctxA* è preparato lavorando nella cappa a flusso laminare verticale indossando guanti monouso, prelevando 1-3 colonie del ceppo dalla piastra di agar nutriente salino o altro idoneo terreno (TSA-S), inoculandole in una provetta contenente 500 µl di acqua nucleasi *free*. La provetta inoculata è incubata nel thermomixer per 5 minuti ± 1 minuto a 95°C ± 2 °C, per poi essere centrifugata a 10.000 x g per 1 minuto. Il surnatante è trasferito in una nuova provetta monouso sterile da 1,5 - 1,7 ml opportunamente identificata, per essere utilizzato successivamente come DNA stampo nella reazione di amplificazione in PCR. Il DNA estratto da ceppo di riferimento di *V. cholerae* contenente il gene *ctxA*, è suddiviso in aliquote monouso, identificate con il numero del ceppo, conservate in congelatore, per l'allestimento del CA+ della PCR.

#### 8.9.4 Allestimento delle reazioni di PCR

Per ogni sessione di PCR allestire un CA- ed un CA+.

##### PCR per il gene *ctxA*

Gene Target	Primer utilizzati	Amplicone (bp)
<i>ctxA</i>	<i>ctxA</i> 94F <i>ctxA</i> 614R	564

Le reazioni di PCR vengono allestite nell'area adibita alla preparazione della PCR-mix, utilizzando la cappa a flusso laminare. Indossare un nuovo paio di guanti in dotazione all'area (al fine di evitare potenziali contaminazioni) prima di effettuare qualsiasi operazione nell'area PCR-mix. Per la PCR viene allestita una miscela unica (Mastermix):

- Compilare il quaderno di laboratorio (Mod.Q.873) e calcolare le quantità dei reagenti necessarie per la preparazione della Mastermix, tenendo conto del numero totale (n) dei campioni da saggiare, compresi il CA+, CE-, CA- ed eventuale CE+, considerando n + 1 campioni se n ≤ a 10 e n + 2 campioni se n > 10.
- Predisporre un supporto per provette per PCR.
- Scongelare il Tampone per PCR 5x, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs 2,5 mM, primers specifici. Miscelare i reagenti scongelati.
- Identificare le provette per PCR con il numero di accettazione dei campioni ed i controlli con le sigle CE-, CE+, CA- e CA+ e la sigla *ctx*.
- Preparare la Mastermix secondo quanto riportato nella tabella seguente:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 12 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAE</i></b>		

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	Volume ( $\mu$ l) per campione
Acqua nucleasi free	-	-	11,75
Tampone per PCR	5X	1x	5,0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM ciascuno	2,0
Primer ctxA 94F	20 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	1,0
Primer ctxA 614R	20 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	1,0
Taq-DNA polimerasi	5 U/ $\mu$ l	0,05 U/ $\mu$ l	0,25
Volume mix	-	-	22,5
DNA	-	-	2,5
Volume totale	-	-	25,0

- Prendere la *Taq*-Dna polimerasi solo al momento in cui occorre addizionarla alla Mastermix e riporla nel congelatore subito dopo l'utilizzo insieme agli altri reagenti.
- Miscelare la Mastermix delicatamente e distribuire 22,5  $\mu$ l in ogni provetta per PCR. Aggiungere alla provetta CA- di PCR 2,5  $\mu$ l dell'acqua nucleasi free utilizzata per la preparazione della Mastermix. Al termine del lavoro accendere i raggi UV e lasciarli agire per almeno 10 minuti.
- Nell'area adibita alla dispensazione degli acidi nucleici aggiungere 2,5  $\mu$ l di DNA estratto dai vari campioni e per ultimo addizionare 2,5  $\mu$ l del DNA del CA+ ed eventuale CE+.
- Controllare che tutte le provette per PCR non presentino gocce sulle pareti o bolle d'aria sul fondo e che siano ben chiuse.
- Nell'area adibita all'amplificazione le reazioni vengono a questo punto incubate nel termociclato impostato con il programma specifico per il gene da ricercare:

**PCR per il gene *ctxA*:**

Temperatura/Tempo	N° Cicli
94°C/2 min	1
94°C/ 2min	
60°C/1 min	30
72°C/1 min	
72°C/10 min	1

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 13 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAE</i></b>		

- Al termine dell'amplificazione rimuovere le provette dal termociclato e, qualora non sottoposte immediatamente ad elettroforesi, mantenere gli amplificati in frigorifero a + 5 °C ± 3 °C.

#### **8.9.5 Elettroforesi orizzontale in gel di agarosio**

Effettuare l'elettroforesi orizzontale nell'area adibita all'analisi post-PCR. Per la visualizzazione dei prodotti di amplificazione, un'aliquota della miscela di reazione (10µl) viene addizionata ad un colorante di caricamento per ottenere una concentrazione finale 1X. Nel caso sia stato utilizzato un Tampone per PCR contenente già il colorante di caricamento, analizzare direttamente 12 µl del prodotto di amplificazione. Viene aggiunto al numero dei campioni da saggiare anche un marker di peso molecolare da 100 bp, fornito già pronto dalla ditta produttrice o preparato secondo le specifiche della ditta produttrice (Es.: 1 µl del marker + 9 µl di acqua + 2 µl di colorante di caricamento).

Preparare un gel di agarosio all'1,0% in Tampone TAE 1X con uno spessore di 3-5 mm (per un gel di 13 x 15 cm preparare una soluzione di 100 ml) contenente il colorante intercalante del DNA, addizionato secondo istruzioni fornite del produttore.

- Pesare l'agarosio e scioglierlo nel tampone TAE 1x, riscaldando nel forno a microonde fino a che la soluzione non diventa limpida. Lasciare raffreddare sotto cappa chimica a temperatura ambiente per 12 minuti ± 2 minuti miscelando di tanto in tanto.
- Nella cappa chimica preparare il vassoio per il gel, applicando i pettini per avere un numero di pozzetti tale da contenere tutti i prodotti di PCR da analizzare più il DNA marker di peso molecolare. Aggiungere al gel il colorante intercalante il DNA secondo istruzioni fornite dal produttore (GelRed Nucleic Acid stain concentrazione 10.000x in acqua, diluizione nel gel 1:10.000: es. 10 µl aggiunti a 100 ml di gel; Midori Green Advanced DNA stain es. 6 µl di colorante in 100 µl di gel). Miscelare, versare il gel nel vassoio ed attendere la completa polimerizzazione.
- Togliere i pettini ed immergere il gel nella cella per elettroforesi contenente TAE 1X, facendo attenzione che il livello del tampone sia tale da ricoprire il gel.
- Compilare il quaderno di laboratorio Mod.Q.873 riportando nell'ordine: MK, il numero di accettazione di ciascun campione, i controlli negativi (CE-, CA-), il/i controllo/i positivi (CE+/CA+) ed il MK. Il MK può essere caricato una sola volta posizionandolo al centro della fila dei pozzetti.
- Seguendo l'ordine indicato nel quaderno di laboratorio caricare 12 µl, o quanto specificato dalla ditta produttrice, del Mk e 12 µl dei prodotti di PCR.
- Posizionare il coperchio dell'apparato elettroforetico, collegare i cavetti all'alimentatore di corrente e far correre il gel a 100 V per 50-60 min.
- Spegnere l'alimentatore, aprire il coperchio dell'apparato elettroforetico e trasferire il gel sul transilluminatore UV per valutare la presenza delle bande d'interesse.
- Visualizzare le bande al transilluminatore UV ed acquisire l'immagine con il

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 14 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

sistema di visualizzazione e documentazione gel e salvarla. Stampare l'immagine ed allegarla al quaderno di laboratorio.

#### **8.9.6 Interpretazione risultati e validità della prova**

##### **8.9.6.1 Criteri di accettabilità della prova**

Per la validità della prova:

CE- e CA-: assenza della banda eletroforetica della dimensione attesa.  
CA+: presenza della banda eletroforetica della dimensione attesa.

Il CA+ deve presentare una banda della grandezza di 564 bp per il gene *ctxA*.

Se il CE- non dà il risultato atteso ripetere la prova dal punto 8.9.1.

Se il CA- non dà il risultato atteso, ripetere la prova dal punto 8.9.4. Se il CA+ non dà il risultato atteso, ripetere la prova dal punto 8.9.4. Se anche dopo la ripetizione dal punto 8.9.4 per il CA+ non si ha il risultato atteso, ripetere la prova dal punto 8.9.3, preparando un nuovo controllo CA+ dal ceppo batterico di *V. cholerae* contenente il gene *ctxA* (8.9.2).

Nel caso in cui anche nella ripetizione analitica l'esito dei controlli non fosse favorevole il processo deve essere interrotto e verificato con l'apertura di una Non Conformità (PRQ.QAS.018).

##### **8.9.6.2 Lettura e interpretazione risultati**

La lettura della prova viene effettuata verificando la presenza/assenza di una banda eletroforetica derivante dall'amplificazione del DNA target (564 bp), la cui dimensione viene determinate per confronto con il MK, costituito da una serie di frammenti di DNA di dimensioni note.

Il campione è considerato negativo (l'isolato batterico di *V. cholerae* non presenta il gene *ctxA*) quando, dopo elettroforesi, non presenta la banda (564 bp), oppure presenta una banda eletroforetica caratterizzata da una velocità di migrazione diversa da quella del CA+.

Il Laboratorio si avvale della facoltà di conservare i campioni ed il DNA da essi estratto a scopo di ricerca nelle modalità che ritiene più opportune.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 15 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAE</i></b>		

## 9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Esprimere il risultato positivo per il gene *ctxA* tossina colerica *V. cholerae* come: Rilevato  
 Esprimere il risultato negativo per il gene *ctxA* tossina colerica *V. cholerae* come: Non rilevato

### 9.1 Validazione del metodo di prova ed incertezza di misura

Il dossier di validazione è residente presso il laboratorio.

Vengono inoltre eseguiti controlli periodici su materiali di riferimento e/o mediante partecipazione a circuiti interlaboratorio.

## 10. RAPPORTO DI PROVA

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

## 11. ARCHIVIAZIONE

Le modalità di archiviazione dei documenti relativi ai campioni sono riportate nella PRT.PGCHIM.022.

## 12. RESPONSABILITÀ

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 la correttezza dei risultati e la verifica degli stessi.

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

## 13. ALLEGATI

**Allegato A:** Soluzioni di lavoro

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 16 di 18
<b>RICERCA GENE ctxA DI VIBRIO CHOLERAЕ</b>		

## Allegato A. Soluzioni di lavoro

### A1: Primer ctxa94F e ctxA 614R Soluzione stock (100µM)

<b>Nome della soluzione</b> Primer ctxa94F o ctxA 614R (100µM)
<b>Modalità di preparazione officinale</b> Ricostituire il primer liofilizzato in acqua nucleasi <i>free</i> aggiungendo un volume in µl pari a quello ottenuto moltiplicando x 10 il numero delle nmoli riportate nel certificato di analisi. Es. nmoles 48,7: aggiungere 487 µl di acqua nucleasi <i>free</i> e mescolare.
<b>Conservazione</b> -20°C+5°C
<b>Scadenza</b> Quattro anni dalla ricostituzione, ulteriormente prorogabili fino a mantenimento della reazione di PCR attesa nel controllo positivo di amplificazione CA+ in linea, previsto nella procedura.
<b>Precauzioni tecniche e di sicurezza</b> Indossare guanti e preparare la soluzione nell'area adibita alla preparazione della PCR-mix.

### A2:: dNTP 2,5mM

<b>Nome della soluzione</b> dNTP 2,5mM
<b>Modalità di preparazione officinale</b> Scongelare a temperatura ambiente i dNTPs 100 mM o in altra concentrazione e agitarli brevemente. Preparare una soluzione 2,5 mM dai dNTPS 100 mM o in altra concentrazione. Es. di preparazione dai dNTPs 100 mM: Pipettare 900 µl di acqua nucleasi <i>free</i> in una provetta sterile da 1,5-1,7 ml. Aggiungere 25 µl di ciascun dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) in concentrazione 100 mM e agitare brevemente. Distribuire la soluzione in aliquote (es. 100-200 µl).
<b>Conservazione</b> -20°C (+5°C)
<b>Scadenza</b> 6 mesi
<b>Precauzioni tecniche e di sicurezza</b> Utilizzare guanti e preparare la soluzione nell'area adibita alla preparazione della PCR-mix.

ISTITUTO ZOO PROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE	MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b>  Rev.000  Pag. 17 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAES</i></b>		

### A3: Primer ctxa94F e ctxA 614R Soluzione pronta all'uso (20 µM)

#### Nome della soluzione

Primer ctxa94F o ctxA 614R (20 µM)

#### Modalità di preparazione officinale

Diluire il primer 100 µM in acqua nucleasi free fino ad ottenere una soluzione a concentrazione 20 µM: es. pipettare 20 µl del primer 100 µM in una provetta da 1,5 ml-1,7 ml ed aggiungere 80 µl di acqua nucleasi free. Mescolare e distribuire la soluzione in aliquote monouso (es. 15-20 µl) identificate con il nome del primer.

#### Conservazione

-20°C (+5°C)

#### Scadenza

Quattro anni dalla ricostituzione, ulteriormente prorogabili fino a mantenimento della reazione di PCR attesa nel controllo positivo di amplificazione CA+ in linea, previsto nella procedura tecnica.

#### Precauzioni tecniche e di sicurezza

Indossare i guanti e preparare la soluzione nell'area adibita alla preparazione della PCR-mix.

### A4: Controllo positivo di amplificazione per *ctxA*

#### Nome della soluzione

DNA estratto da *V. cholerae* ATCC 9459 (CA+ PCR ctxA)

#### Modalità di preparazione officinale

Il DNA viene preparato secondo quanto riportato ai punti 8.9.2 e 8.9.3 della procedura. Il DNA estratto è suddiviso in aliquote monouso (es. 20 µl ciascuna) identificate con il numero del ceppo.

#### Conservazione

-20°C+5°C

#### Scadenza

Un anno prorogabile fino ad ottenimento della reazione attesa (amplificazione nella PCR).

#### Precauzioni tecniche e di sicurezza

Utilizzare guanti e preparare la soluzione nell'area adibita all'estrazione acidi nucleici nella cappa a flusso laminare.

<b>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE</b>	<b>MOD.QAS.030 Rev. 006  PROCEDURA OPERATIVA TECNICA METODO INTERNO</b>	<b>PRT.S9MOLLAN.001</b> Rev.000 Pag. 18 di 18
<b>RICERCA GENE <i>ctxA</i> DI <i>VIBRIO CHOLERAE</i></b>		

## A5: SOLUZIONE STOCK TAE 50X

### Nome della soluzione

TAE 50X

### Modalità di preparazione officinale

Pesare 48,4 g di Tris (Trizma base), aggiungere 11,4 ml di acido acetico glaciale e 20 ml di EDTA 0,5 M pH 8. Portare a volume di 200 ml con acqua demineralizzata e aggiustare il pH a 8,3±0,1.

### Conservazione

Temperatura ambiente

### Scadenza

6 mesi

### Precauzioni tecniche e di sicurezza

Utilizzare guanti e mascherina. Evitare il contatto con occhi, pelle e apparato respiratorio.