

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 1 di 14
---------------------	---	---

B. Bertasi	M.N. Losio	A. Petteni	G. Varisco	Correzione refusi: - range di temperatura termoblocchi, - preparazione del campione "Prodotti vegetali (esclusi frutti di bosco)" Inserimento molarità HCl ed NaOH con risposta nota ACCREDIA del 02/09/2013 Prot. S26060/13/ST/sg Revisione del metodo che non ha comportato la contemporanea revisione di PSV ed RV
STESURA	VERIFICA	CONVALIDA	APPROVAZIONE	MOTIVO REVISIONE

1. TITOLO

METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE *seminested* PCR

2. SCOPO (OGGETTO) E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il seguente documento descrive il metodo di prova interno per rilevare la presenza di tutti i genotipi del virus dell'Epatite A (famiglia *Picornaviridae*, genere *Hepatovirus*, specie Epatite virale A virus) attraverso l'amplificazione di una sequenza specifica di RNA virale, situata nella regione del genoma codificante per le proteine del capsido (regione VP3-VP1). E' un metodo qualitativo e si applica agli alimenti, all'acqua ed ai campioni biologici.

3. TERMINI E DEFINIZIONI

PCR: polymerase Chain reaction

RT: Retrotrascrizione

Primer: breve sequenza oligonucleotidica necessaria per l'innescare della reazione PCR

RNA: acido ribonucleico

DNA: acido desossiribonucleico

cDNA: (complementary DNA) acido desossiribonucleico prodotto della retrotrascrizione dell'RNA ad opera dell'enzima DNA polimerasi RNA dipendente

Controllo di processo: un virus aggiunto alla porzione di campione nel primo step favorevole prima dell'estrazione, allo scopo di verificare l'efficienza dell'estrazione. Esempi di virus utilizzabili come controlli di processo nella ricerca di HAV includono il virus Mengo e il Calicivirus Felino.

Master mix: miscela contenente tutti i reagenti per la reazione

F.C.: fattore di correzione utilizzato per la preparazione della master mix PCR

4. PRINCIPIO

La metodica si articola in sei fasi principali successive:

- Preparazione del campione
- Estrazione dell'RNA totale
- Allestimento della reazione di RT
- Allestimento della reazione PCR (1° amplificazione)
- Allestimento della reazione PCR (amplificazione *seminested*)
- Analisi dei prodotti di reazione mediante elettroforesi

5. APPARECCHIATURE

Al di là delle apparecchiature e/o strumentario base di uso corrente in laboratorio si riporta quanto espressamente richiamato nel presente metodo di prova.

- Bilancia tecnica con risoluzione di 0,01 g e campo di utilizzo da 0,01 a 100 g
- Bilancia tecnica con risoluzione di 0,5 g e campo di utilizzo da 1 a 500 g
- Congelatore termostato a -24 ± 6 °C
- Congelatore termostato a ≤ -65 °C
- Frigorifero termostato a $+5 \pm 3$ °C
- Cappa a flusso laminare
- Frullatore da laboratorio con relativi bicchieri autoclavabili (in vetro o acciaio)
- Agitatore vibrante tipo vortex
- Rampe di filtrazione (o clessidre di filtrazione)

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 2 di 14
---------------------	---	---

- Termoblocco per microprovette da 1,5/2,0 ml a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ (per preparazione del campione) e $40 \pm 5^\circ\text{C}$ (per estrazione RNA)
- Centrifuga refrigerata (con possibilità di impostazione fino ad almeno 10000 x g)
- Microcentrifuga refrigerata (con possibilità di impostazione fino ad almeno 13000 x g)
- Micropipette monocanale in grado di erogare volumi variabili nel campo 2 μl – 1000 μl
- Cappa da PCR
- Thermal Cycler con coperchio riscaldato
- Forno a microonde
- Apparato per elettroforesi
- Transilluminatore UV per acidi nucleici
- Apparato per acquisizione di immagini (opzionale in funzione del tipo di transilluminatore)

6. VETRERIA

Al di là della vetreria base di uso corrente in laboratorio si riporta quanto espressamente richiamato nel presente metodo di prova.

- Pre-filtri di carta (15 cm di diametro)
- Clessidre con filtro in nitrato di cellulosa da 50 mm di diametro, porosità 0,45 μm
- Piastre Petri
- Provette in polipropilene da 15/50 ml fondo a V
- Puntali per micropipette con barriera anticontaminazione
- Microprovette sterili monouso tipo eppendorf DNase/RNase free, da 1,5 e/o 2 ml
- Microprovette per PCR safe lock da 0,2 ml

7. REAGENTI

Reagenti per preparazione del campione

- **REAGENTI PRONTO USO**
 - PBS (REA 01/012)
 - Idrossido di sodio (1 M)
 - Acido cloridrico (1 M)
 - Etanolo assoluto
 - NaCl
 - Cloruro di alluminio esaidrato
 - Pectinase solution (from *Aspergillus niger*)

➤ PREPARAZIONE SOLUZIONI

Acqua ultrapura (tipo MilliQ)	
Preparazione	Autoclavare l'acqua a 121°C per 20 minuti
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	12 mesi dalla preparazione

Soluzione proteinasi K	
Composizione	Proteinasi K 0,1 mg/ml
Preparazione	Per 100 ml di soluzione: diluire la proteinasi K 10 mg/ml in acqua ultrapura (tipo MilliQ) sterile per ottenere una concentrazione finale di 0,1 mg/ml.
Conservazione	$-24 \pm 6^\circ\text{C}$
Validità	6 mesi dalla preparazione se conservata a $-24 \pm 6^\circ\text{C}$; una volta scongelata conservare a $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ per una settimana

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 3 di 14
---------------------	---	---

Tampone Glicina	
Composizione	Glicina 0,05 M (per preparazioni gastronomiche) ed 1 M (per vegetali) ed NaCl 0,14 M
Preparazione	Pesare glicina ed NaCl per ottenere una concentrazione finale rispettivamente di 0,05 M (oppure 1 M) e 0,14 M in 1 litro di acqua demineralizzata. Tenere in agitazione a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei sali. Portare a pH 9,2 con NaOH. Filtrare con filtri da 0,2 µm
Conservazione	5 ± 3°C
Validità	6 mesi dalla preparazione

PEG 8000 (poliethylenglycol 8000) al 50%	
Composizione	PEG 8000 500 g/l, NaCl 75 g/l
Preparazione	Pesare 500 g di PEG, 75 g di NaCl e portare a volume finale di un litro con acqua demineralizzata. Porre in agitazione magnetica (a caldo) e portare ad ebollizione (per 4-5 ore) fino alla completa dissoluzione dei sali. La dissoluzione può essere ottenuta anche in autoclave o microonde
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	6 mesi dalla preparazione

Tris Glicina 1% Beef extract (TGBE)	
Composizione	Tris base (12,1 ± 0,2 g), Glicina (3,8 ± 0,1 g) ed estratto di carne (10 ± 1,0 g)
Preparazione	Sciogliere tutti i reagenti in 1 litro di acqua demineralizzata. Portare il pH a 9,5 ± 0,2 a 25°C. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti.
Conservazione	5 ± 3 °C
Validità	6 mesi dalla preparazione

5X PEG/NaCl solution (50% (P/V) PEG 8000 in acqua, 1,5 M NaCl)	
Composizione per 1 litro	Polietilenglicole (PEG) 8000 (500 ± 2 g) e NaCl (87 ± 1 g)
Preparazione	Dissolvere i reagenti in 450 ± 5 ml di acqua demineralizzata, riscaldare se necessario. Regolare il volume a 1000 ± 10 ml con acqua demineralizzata e mescolare bene. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti.
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	6 mesi dalla preparazione

cloroformio/butanolo	
Composizione	Cloroformio 50%, butanolo 50%
Preparazione	Preparare una soluzione di cloroformio/butanolo (v/v)
Conservazione	/
Validità	Preparare in occasione di ogni seduta d'analisi

Beef extract	
Composizione	3% di Beef extract
Preparazione	Preparare un quantitativo di soluzione sufficiente per il numero totale di campioni in esame (5 ml/campione). Portare a pH 9,5 con NaOH
Conservazione	/
Validità	Preparare in occasione di ogni seduta d'analisi

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 4 di 14
---------------------	---	---

Elution Buffer	
Composizione	Tris-HCl 100 mM, glicina 50 mM, beef extract powder 3%, MgCl ₂ 50 mM, Pectinase 180 U/l
Preparazione	Per un litro di soluzione: pesare Tris-HCl per ottenere una concentrazione finale di 100 mM, glicina 50 mM, 3% di Beef extract powder, MgCl ₂ 50 mM, Pectinase 180 U. Aggiungere un volume di H ₂ O ultrapura (tipo MilliQ), inferiore al volume finale e porre in agitazione a temperatura ambiente. Portare a pH 9,5 con NaOH. Portare a volume finale con H ₂ O
Conservazione	/
Validità	Preparare in occasione di ogni seduta d'analisi

Reagenti per estrazione

➤ REAGENTI PRONTO USO

- Etanolo assoluto

➤ KIT

QIAamp UltraSens Virus Kit	Fornitore	Conservazione	Validità
Buffer AC Buffer AR Buffer AB (concentrato) Buffer AW1 (concentrato) Buffer AW2 (concentrato) Buffer AVE Proteinase K Carrier RNA QIAamp Spin Columns Collection tubes (2 ml)	QIAGEN	Temperatura ambiente	Definita dal produttore

➤ PREPARAZIONE SOLUZIONI

BUFFER AVE + RNA CARRIER (QIAamp UltraSens Virus Kit)

Preparazione	Aggiungere 310 µl di Buffer AVE alla provetta di RNA Carrier liofilizzato in modo da ottenere una soluzione 1 µg/µl; dissolvere l'RNA carrier e aliquotare
Conservazione	-24 ± 6 °C
Validità	Definita dal produttore

SOLUZIONE BUFFER AB (QIAamp UltraSens Virus Kit)

Preparazione	Aggiungere 66 ml di etanolo assoluto al buffer AB concentrato; miscelare per inversione della bottiglia 10 volte per ottenere una soluzione omogenea
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	Definita dal produttore

SOLUZIONE BUFFER AW1 (QIAamp UltraSens Virus Kit)

Preparazione	Aggiungere 125 ml di etanolo assoluto al buffer AW1 concentrato; miscelare per inversione della bottiglia 10 volte per ottenere una soluzione omogenea
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	Definita dal produttore

SOLUZIONE BUFFER AW2 (QIAamp UltraSens Virus Kit)

Preparazione	Aggiungere 160 ml di etanolo assoluto al buffer AW2 concentrato; miscelare per inversione della bottiglia 10 volte per ottenere una soluzione omogenea
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	Definita dal produttore

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 5 di 14
---------------------	---	---

Reagenti per retrotrascrizione e PCR

Reagenti	Fornitore	Conservazione	Validità
Reverse Transcriptase	Fermentas	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
Buffer 5X Trascrittasi	Fermentas	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
Go Taq Flexi DNA Polymerase	Promega	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
5X green GoTaq Flexi reaction buffer	Promega	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
dATP dCTP dGTP dTTP	Promega	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
MgCl ₂	Promega	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
Rnase Inhibitor	Fermentas	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore
Random hexamers	Roche Diagnostics	- 24 ± 6 °C	Definita dal produttore

➤ PREPARAZIONE SOLUZIONI

Oligonucleotidi	
Sequenza	AV1: 5' GGA AAT GTC TCA GGT ACT TTC TTT G 3' AV2: 5' GTT TTG CTC CTC TTT ATC ATG CTA TG 3' AV3: 5' TCC TCA ATT GTT GTG ATA GC 3'
Concentrazione	50 pmol/μl (50 μM)
Conservazione	- 24 ± 6 °C
Preparazione	Risospesare i primer liofilizzati fino alla concentrazione di 50pmol/μl seguendo le indicazioni contenute nel foglio di accompagnamento fornito dalla ditta
Validità	5 anni dalla data di preparazione

H₂O ultrapura (tipo MilliQ) per mix di reazione	
Preparazione	Filtrare l'H ₂ O ultrapura (tipo MilliQ) mediante filtri a porosità 0,22 μm, aliquotare in provette ed esporre ai raggi UV per 30 minuti (3 lampade da 15W, >600lux)
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	3 mesi dalla preparazione delle aliquote

dNTPs (10 mM)	
Composizione	2,5 mM di ciascun tipo di dNTP in acqua tipo milliQ
Preparazione	Miscelare dATP, dTTP, dGTP e dCTP (ciascuno alla concentrazione di 2,5 mM) in modo da ottenere una soluzione di 10 mM
Conservazione	- 24 ± 6 °C
Validità	Definita dal produttore

Reagenti per elettroforesi

➤ REAGENTI PRONTO USO

Reagenti	Fornitore	Conservazione	Validità
Marcatore di peso molecolare (100 bp ladder)	/	+ 5 ± 3°C	Definita dal produttore
Glicerolo	/	Temperatura ambiente	Definita dal produttore

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 6 di 14
---------------------	---	---

➤ PREPARAZIONE SOLUZIONI

EDTA 0,5 M pH 8 (Acido etilen diammino tetra acetico)	
Composizione	EDTA sale disodico biidrato 186,1 g/l in acqua ultrapura (tipo MilliQ)
Preparazione	Sciogliere il sale in acqua ultrapura (tipo MilliQ) mediante agitazione e portare il pH a 8 con NaOH (il sale non si scioglie finchè il pH non raggiunge il valore desiderato)
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	Un anno dalla data di preparazione

Tampone per elettroforesi TAE 50X	
Composizione (per litro)	Tris base: 242 g Acido acetico glaciale: 57,1 ml EDTA 0,5 M pH 8: 100 ml Acqua ultrapura (tipo mMilliQ): quanto basta a 1000 ml
Preparazione	Sciogliere il Tris base in acqua demineralizzata e aggiungere di seguito gli altri componenti. Diluire la soluzione madre alla concentrazione d'uso 1X
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	Un anno dalla preparazione

Gel d'agarosio	
Composizione per 100 ml	Agarosio per elettroforesi di acidi nucleici: 2,5 g (per gel al 2,5%) o 4 g (per gel al 4%) Tampone TAE 1X: 100 ml Etidio bromuro (1 mg/ml): 35 µl
Preparazione	Sciogliere l'agarosio in tampone TAE 1X utilizzando il forno a microonde; raffreddare con acqua corrente per 2 minuti ed aggiungere 35 µl di etidio bromuro; versare il gel nel vassoio con il pettine già posizionato per creare i pozzetti e lasciare solidificare a temperatura ambiente per 20 ± 5 minuti in cappa a flusso laminare
Conservazione	+ 5 ± 3 °C
Validità	24 ore se correttamente conservato al buio

Soluzione di etidio bromuro (1 mg/ml)	
Composizione per 100 ml	Etidio bromuro: compressa da 100 mg Acqua demineralizzata: 100 ml
Preparazione	Sciogliere la compressa in acqua ultrapura (tipo mMilliQ) mantenendola al buio; distribuire in aliquote e conservare a 25 ± 15 °C
Conservazione	Temperatura ambiente al buio
Validità	5 anni dalla data di preparazione

NOTA: possono essere utilizzati coloranti alternativi di cui sia dimostrata la medesima efficacia

Soluzione colorante per elettroforesi 60X	
Composizione per 100 ml	Blu di bromo fenolo: 2,5 g Glicerolo: 30 ml Acqua ultrapura (tipo mMilliQ): 67,5 ml
Preparazione	Sciogliere il colorante in acqua mediante agitazione ed aggiungere il glicerolo; mantenere in agitazione fino ad ottenere una soluzione omogenea. Diluire 1:10 in H ₂ O ultrapura (tipo mMilliQ) ed aliquotare la soluzione alla concentrazione 6X
Conservazione	Temperatura ambiente
Validità	5 anni dalla data di preparazione

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 7 di 14
--------------	---	---

Controlli

CONTROLLI NEGATIVI

- controllo negativo di estrazione (acqua ultrapura tipo milliQ) sterile; viene allestito al momento dell'estrazione ed eseguito per ogni set di campioni.
- controllo negativo di processo, costituito da una matrice negativa, da effettuarsi ogni 6 mesi. La matrice è conservata a -24 ± 6 °C . In occasione dell'esecuzione di questo tipo di controllo viene omesso il controllo negativo di estrazione.
- controllo negativo di retrotrascrizione costituito da 4,5 µl di acqua ultrapura (tipo milliQ). Viene allestito al momento dell'RT ed eseguito per ogni set di campioni.
- controllo negativo di PCR costituito da 5 µl di acqua ultrapura (tipo milliQ). Viene allestito al momento della PCR ed eseguito per ogni set di campioni.
- controllo negativo di seminested PCR costituito da 5 µl di acqua ultrapura (tipo milliQ). Viene allestito al momento della nested PCR ed eseguito per ogni set di campioni.

CONTROLLI POSITIVI

- un controllo positivo di estrazione costituito da 100 µl di sospensione virale di riferimento, aggiunti a 900 µl di acqua ultrapura (tipo milliQ).
- un controllo positivo di PCR costituito da 5 µl di cDNA ottenuto da estrazioni precedenti a quella in corso. Viene eseguito per ogni set di campioni.
- un controllo positivo di processo, costituito da una matrice positiva, da eseguirsi ogni 6 mesi a livello della fase di preparazione del campione

NOTA: tutti i controlli positivi vanno posizionati alla fine della serie di campioni da sottoporre a prova, in ciascuna fase corrispondente. I controlli delle fasi che precedono vengono inseriti anche in tutte le fasi che seguono, passando da uno step all'altro.

8. TERRENI CULTURALI

Non previsti

9. KITS DIAGNOSTICI

Non previsti

10. SISTEMI DI SAGGIO

Non previsti

11. PROCEDIMENTO

Premessa

Aspetti connessi alla sicurezza:

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento alla PG 00/015 (Norme generali di comportamento e sicurezza in laboratorio), alla "Raccolta delle schede di sicurezza" dell'Istituto, alla PG 00/016 (Tipologie e modalità di smaltimento dei rifiuti dell'Istituto)

Caratteristiche degli ambienti di prova:

Le diverse aree destinate alla tecnica PCR Real-Time devono essere separate le une dalle altre, allo scopo di limitare le contaminazioni durante l'esecuzione delle diverse fasi; in particolare esistono zone dedicate all'estrazione dell'RNA virale, alla preparazione delle mix di reazione ed all'amplificazione del cDNA.

Preparazione del campione

PREPARAZIONI GASTRONOMICHE

Effettuare tutti i passaggi sotto cappa a flusso laminare

- I prodotti vanno prelevati in un quantitativo minimo di 25 g e massimo di 75 g e posti in un sacchetto con filtro per stomacher
- Versare nei sacchetti tampone glicina 0,05 M pH 9,2 in rapporto 1:1 (p/v). Se si dispone di un quantitativo inferiore di prodotto mantenere i rapporti p/v con il tampone glicina

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 8 di 14
--------------	---	---

- Sottoporre il prodotto ad omogeneizzazione in stomacher per almeno 30 secondi alla massima velocità consentita dallo strumento
- Mantenere a 5 ± 3 °C per 30 minuti agitando di tanto in tanto
- Prelevare il surnatante e porlo in provette da 50 ml
- Centrifugare a 10000 x g per 20 minuti a 4°C
- Prelevare il sovrnatante e trasferirlo in nuove provette da 50 ml ed aggiungere la soluzione di PEG 8000 in rapporto 1:4 v/v (esempio: per 120 ml di sovrnatante, aggiungere 40 ml di PEG 8000; si ottiene un volume finale di 160 ml)
- Agitare energicamente con vortex le provette da 50 ml in modo da distribuire uniformemente il PEG 8000 in soluzione e precipitare overnight a 5 ± 3 °C
- Centrifugare a 10000 x g per 45 minuti a 4°C
- Eliminare il sovrnatante e risospendere il pellet in 10 ml di H₂O ultrapura (tipo MilliQ) sterile (raffreddata a 5 ± 3 °C), avendo cura di sciogliere eventuali agglomerati
- Centrifugare a 10000 x g per 20 minuti a 4°C
- Recuperare il sovrnatante in provette da 50 ml ed aggiungere PEG 8000 in rapporto 1:4
- Agitare energicamente con vortex le provette da 50 ml in modo da distribuire uniformemente il PEG 8000 in soluzione e precipitare overnight a 5 ± 3 °C
- Centrifugare a 10000 x g per 45 minuti a 4°C
- Eliminare il sovrnatante e risospendere il pellet in 2 ml di H₂O ultrapura (tipo milliQ) sterile (raffreddata a 5 ± 3 °C)
- Centrifugare a 10000 x g per 20 minuti a 4°C
- Raccogliere il sovrnatante e suddividerlo in due aliquote da 1 ml
- Procedere all'estrazione di RNA da 1 ml di surnatante o conservare le aliquote di omogenato a ≤ -65 °C.

PRODOTTI VEGETALI (ESCLUSI FRUTTI DI BOSCO)

- Triturare grossolanamente (in pezzi da 2,5 cm x 2,5 cm x 2,5 cm) 25 g di prodotti vegetali e metterli in un sacchetto per stomacher con filtro
- Aggiungere 40 ml di TGBE
 - Incubare a temperatura ambiente in costante agitazione per 20 minuti.
 - Recuperare l'eluato in un nuovo tubo di raccolta
 - Centrifugare a 10000 x g per 30 minuti a 4°C
 - Recuperare l'eluato in un nuovo tubo di raccolta e regolare il pH a 7,2 con HCl
 - Aggiungere 0,25 volumi di 5X PEG/NaCl (per avere una concentrazione finale del 10% PEG e 0,3 M di NaCl) ed omogeneizzare agitando per un minuto
 - Incubare in costante agitazione per 60 minuti a 5 ± 3 °C
 - Centrifugare a 10000 x g per 30 minuti a 4°C (dividere in due provette il volume se necessario)
 - Eliminare il surnatante
 - Centrifugare il pellet a 10000 x g per 5 minuti a 4°C
 - Risospendere il pellet in 1 ml di PBS (se il campione è stato suddiviso in 2 tubi, risospendere il pellet delle 2 aliquote 500 µl di PBS ciascuna)
 - Procedere all'estrazione dell'RNA virale da 1 ml oppure conservare a ≤ -65 °C fino al momento dell'estrazione.

PRODOTTI VEGETALI (FRUTTI DI BOSCO)

- Essendo i frutti di bosco di dimensioni inferiori a 2,5 cm x 2,5 cm x 2,5 cm, pesare 25 g di prodotto e metterli in un sacchetto per stomacher con filtro
- Aggiungere 40 ml di TGBE e 30 U di Pectinasi
 - Incubare a temperatura ambiente in costante agitazione per 20 minuti. Controllare il pH ogni 10 minuti e per tutto il periodo di incubazione che l'eluato non abbia un pH acido: se scende al di sotto di 9,0 aggiungere NaOH per regolare il pH a 9,5. Prolungare il periodo d'incubazione di 10 minuti ogni volta che il valore del pH viene regolato
 - Recuperare l'eluato in un nuovo tubo di raccolta
 - Centrifugare a 10000 x g per 30 minuti a 4°C
 - Recuperare l'eluato in un nuovo tubo di raccolta e regolare il pH a 7,2 con HCl
 - Aggiungere 0,25 volumi di 5X PEG/NaCl (per avere una concentrazione finale del 10% PEG e 0,3 M di NaCl) ed omogeneizzare agitando per un minuto

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 9 di 14
--------------	---	---

- Incubare in costante agitazione per 60 minuti a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Centrifugare a 10000 x g per 30 minuti a 4°C (dividere in due provette il volume se necessario)
- Eliminare il surnatante
- Centrifugare il pellet a 10000 x g per 5 minuti a 4°C
- Risospendere il pellet in 1 ml di PBS (se il campione è stato suddiviso in 2 provette, risospendere il pellet delle 2 aliquote in 500 μl di PBS ciascuna)
- chiarificare aggiungendo 500 μl della soluzione cloroformio/butanolo; agitare in vortex e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti)
- Centrifugare a 10000 x g per 15 minuti a 4°C e trasferire il surnatante in una nuova provetta
- Procedere all'estrazione dell'RNA virale da 1 ml della fase acquosa (sovranatante), oppure conservarla a $\leq -65^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'estrazione

FECI

In caso di feci molli, dure o mucose, prelevare con un'ansa da 100 μl il materiale e stemperarlo in 900 μl di acqua ultrapura (tipo MilliQ) sterile mantenuta a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. In caso di feci liquide aggiungere 100 μl a 900 μl di acqua ultrapura sterile mantenuta a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Miscelare con vortex e centrifugare a 10000 x g per 5 minuti. Recuperare il sovranatante e procedere all'estrazione.

ACQUA

Eseguire tutte le operazioni di seguito elencate, tranne la filtrazione con rampa, sotto cappa a flusso laminare

- Prelevare 500 ml di campione
- Se l'acqua è torbida, pre-filtrare con pre-filtri di carta
- Portare il pH a 3,5 con HCl, misurando con cartina tornasole
- Aggiungere cloruro di alluminio esaidrato alla concentrazione finale di 0,5 μM .
- Dopo il prelievo del campione disinfettare la superficie di appoggio con ipoclorito di sodio all'1%
- Versare ciascun campione in clessidre sterili con filtro pre-montato in nitrato di cellulosa
- Collegare ad una pompa da vuoto ed applicare il vuoto
- Dopo aver filtrato, buttare il liquido e adagiare il filtro in una piastra Petri sterile

NOTA In alternativa alla clessidra, utilizzare le rampe di filtrazione, accuratamente disinfettate con alcool al 70% e flambatura. Recuperare poi il filtro in piastre Petri.

- Bagnare il filtro per 5 minuti con 5 ml di beef extract
- Recuperare in una provetta i 5 ml di soluzione di beef extract
- Procedere all'estrazione dell'RNA virale da 1 ml, oppure conservare a $\leq -65^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'estrazione.

Estrazione dell'acido nucleico

Preparare, in una provetta da 2 ml, 1 ml di campione equilibrato a temperatura ambiente

- Preparare, in una provetta da 2 ml, 1 ml di acqua ultrapura tipo MilliQ che costituirà il bianco di estrazione
- Aggiungere a tutte le provette 800 μl di Buffer AC + 5,6 μl di RNA carrier (non miscelare il Buffer AC all'RNA carrier prima di addizionarli al campione, poiché ciò può causare un recupero variabile dell'RNA)
- Agitare per inversione la provetta 3 volte e poi agitare con vortex per 10 secondi
- Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti (non lisare i campioni per più di 15 minuti)
- Centrifugare a 1200 x g per 3 minuti a 4°C
- Eliminare il surnatante
- Preparare una miscela costituita da 300 μl di buffer AR, preriscaldato a $+60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, e 20 μl di proteinasi K; agitare con vortex e aggiungere 320 μl di tale miscela al campione
- Agitare con vortex alcuni secondi per risospendere il pellet
- Incubare a $+40,0 \pm 5^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti nel termoblocco a 1400 rpm
- Eseguire uno spin per eliminare le gocce dall'interno del coperchio delle provette
- Aggiungere 300 μl di buffer AB, agitare con vortex ed eseguire uno spin
- Trasferire 700 μl di lisato in una QIAamp spin column posizionata in un tubo di raccolta da 2 ml senza bagnare il bordo

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 10 di 14
---------------------	---	--

- Centrifugare a 5000 x g per 1 minuto a 4°C
- Eliminare il tubo di raccolta contenente il sovrantante e posizionare la colonna in un nuovo tubo di raccolta
- Aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare a 6000 x g per 1 minuto a 4°C
- Eliminare il tubo di raccolta contenente il sovrantante e posizionare la colonna in un nuovo tubo di raccolta
- Aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare a 16000 x g per 3 minuti a 4°C
- Eliminare il tubo di raccolta contenente il sovrantante e posizionare la colonna in una provetta da 1,5 ml
- Eluire aggiungendo 30 µl di Buffer AVE e centrifugare a 6000 x g per 1 minuto a 4°C
- Ripetere l'eluizione con 30 µl di Buffer AVE e centrifugare a 6000 x g per 1 minuto a 4°C

L'RNA estratto può essere conservato a +5 ± 3 °C per un massimo di 1 ora. In alternativa congelare l'RNA a ≤ -65 °C.

Retrotrascrizione dell'RNA

La reazione di retrotrascrizione (RT) viene eseguita secondo le indicazioni contenute nella seguente tabella.

REAGENTI	CONC.FINALE	VOLUMI per campione
Buffer 5X	1X	8 µl
dNTPs (10 mM)	4 mM	16 µl
MgCl ₂	5 mM	8 µl
Random hexamers (50 µM)	2,5 µM	2 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 U/µl	1 µl
Trascrittasi Inversa (200 U/µl)	2,5 U/µl	0,5 µl
Volume totale		35,5

NOTA Le quantità vanno moltiplicate per il numero di reazioni previste aumentato di un fattore di correzione (F.C.) pari almeno al 10% del totale del numero di reazioni (considerando le perdite di master mix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali). Ovè il risultato dell'aumento delle reazioni contenesse cifre decimali, considerare, per il numero delle reazioni, un valore intero superiore.

- Distribuire in ciascuna provetta da 0,2 ml la miscela di reazione in ragione di 36,5 µl per campione.
- Aggiungere 4,5 µl di acqua ultrapura tipo MilliQ nella provetta identificata come controllo negativo di RT
- Aggiungere 4,5 µl di controllo negativo di estrazione nella provetta identificata come controllo negativo di estrazione
- Aggiungere 4,5 µl di estratto di ciascun campione nelle provette identificate come campioni
- Aggiungere 4,5 µl di RNA estratto dal controllo positivo di estrazione nella provetta identificata come controllo positivo di estrazione

Trasferire le microprovette nel Thermal Cycler e impostare il profilo termico secondo i parametri riportati in tabella:

Profilo termico di retrotrascrizione (RT)

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Impostazione del coperchio	104 °C		
Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA	42 °C	60 minuti	1
In attivazione enzima	94 °C	5 minuti	1

Congelare i cDNA a - 24 ± 6 °C se non si intende effettuare immediatamente l'amplificazione dell'acido nucleico.

Amplificazione dell'acido nucleico

La reazione di amplificazione viene eseguita secondo le indicazioni contenute nella seguente tabella:

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 11 di 14
---------------------	---	--

REAGENTI	CONC. FINALE	VOLUMI per campione
H ₂ O milliQ	//	12,375 µl
Green Go Taq Flexi Buffer (5X)	1x	5 µl
dNTPs (10 mM) pool	0,4 mM	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM	1 µl
AV1 (50 µM)	0,5 µM	0,25 µl
AV2 (50 U/µl)	0,5 µM	0,25 µl
Go Taq Flexi Pol.(5 U/µl)	0,025 U/µl	0,125 µl
Volume totale		20 µl

NOTA Le quantità vanno moltiplicate per il numero di reazioni previste aumentato di un fattore di correzione (F.C.) pari al 10% del totale del numero di reazioni (considerando le perdite di mastermix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali). Ove il risultato dell'aumento delle reazioni contenesse cifre decimali, considerare, per il numero delle reazioni, un valore intero superiore

- Distribuire 20 µl di master mix per ciascuna delle provette sterili da 0,2 ml necessarie per la reazione di PCR.
- Aggiungere 5 µl di controllo negativo dalla retrotrascrizione per un volume finale di 25 µl.
- Aggiungere 5 µl del controllo negativo di estrazione, per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del controllo negativo di PCR (acqua ultrapura tipo MilliQ) per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl di cDNA per ciascun campione per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del cDNA di controllo positivo di estrazione per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del cDNA di controllo positivo ottenuto da estrazioni precedenti a quella in corso, per un volume finale di 25 µl

Trasferire le microprovette nel Thermal Cycler, il profilo termico è impostato secondo i parametri riportati nella seguente tabella

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Impostazione del coperchio	104 °C		
Denaturazione	94 °C	5 minuti	1
Denaturazione	94 °C	35 secondi	40
Annealing	55 °C	1 minuto	
Estensione	72 °C	1 minuto e 15 secondi	
Estensione finale	72 °C	7 minuti	1

Amplificazione seminested

Le reazioni di amplificazione viene eseguita secondo le indicazioni contenute nella seguente tabella

REAGENTI	CONC. FINALE	VOLUMI per campione
H ₂ O milliQ		12,375 µl
Green Go Taq Flexi Buffer (5X)	1x	5 µl
dNTPs (10 mM) pool	0,4 mM	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM	1 µl
AV2 (50 µM)	0,5 µM	0,25 µl
AV3 (50 U/µl)	0,5 µM	0,25 µl
Go Taq Flexi Pol.(5 U/µl)	0,025 U/µl	0,125 µl
Volume totale		20 µl

NOTA Le quantità vanno moltiplicate per il numero di reazioni previste aumentato di un fattore di correzione (F.C.) pari al 10% del totale del numero di reazioni (considerando le perdite di mastermix dovute all'adesione della miscela alle pareti della microprovetta e/o puntali). Ove il risultato dell'aumento delle reazioni contenesse cifre decimali, considerare, per il numero delle reazioni, un valore intero superiore

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 12 di 14
---------------------	---	--

- Distribuire 20 µl di master mix per ciascuna delle provette sterili da 0,2 ml necessarie per la reazione di PCR.
- Aggiungere 5 µl di controllo negativo di retrotrascrizione ottenuto dalla prima amplificazione per un volume finale di 25 µl.
- Aggiungere 5 µl del controllo negativo di estrazione, ottenuto dalla prima amplificazione, per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del controllo negativo di PCR ottenuto dalla prima amplificazione per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del controllo negativo di *seminested* PCR (acqua ultrapura tipo MilliQ) per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl di DNA ottenuto dalla prima amplificazione per ciascun campione per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del DNA di controllo positivo di estrazione ottenuto dalla prima amplificazione per un volume finale di 25 µl
- Aggiungere 5 µl del DNA di controllo positivo di PCR ottenuto dalla prima amplificazione , per un volume finale di 25 µl

Trasferire le microprovette nel Thermal Cycler; il profilo termico è impostato secondo i parametri riportati in tabella

STEP	Temperatura	Tempo	N° cicli
Impostazione del coperchio	104 °C		
Denaturazione	94 °C	5 minuti	1
Denaturazione	94 °C	30 secondi	30
Annealing	50 °C	30 secondi	
Estensione	72 °C	30 secondi	
Estensione finale	72 °C	5 minuti	1

Analisi dei prodotti della reazione

Allestire un gel di agarosio al 2,5 %

Caricare 5 µl dell'amplificato partendo dal secondo pozzetto nella fila del gel. Caricare 4 µl del marcatore di peso molecolare (100 bp DNA Ladder) nel primo e nell'ultimo pozzetto disponibile.

Se il numero di campioni supera il numero dei pozzetti contenuti nella fila del gel, distribuire i campioni in più file, assicurandosi che per ogni fila venga caricato l'amplificato derivante del controllo positivo di PCR

NOTA Nel caso in cui le reazioni di PCR e nested siano state allestite con buffer non colorato, miscelare 2 µl di soluzione colorante per elettroforesi con 5 µl di ciascun amplificato della reazione nested. Caricare 5 µl della miscela ottenuta nel pozzetto del gel secondo le modalità descritte in precedenza.

Sottoporre i campioni ad elettroforesi su gel di agarosio a voltaggio costante (5 V/cm) per 40 minuti ± 10 minuti. Al termine della corsa visualizzare il gel su un transilluminatore a raggi UV e fotografare.

Nel caso si riscontrino difficoltà nella lettura del gel a causa di bande non sufficientemente separate, allestire un gel d'agarosio al 4%, ricaricare i medesimi campioni ed effettuare la corsa a voltaggio costante (3,75 V/cm).

12. ESPRESSIONE DEL/I RISULTATO/I

Modalità di calcolo

L'analisi dei risultati viene eseguita valutando la presenza o l'assenza di bande specifiche all'interno dei campioni e di tutti i controlli. Il campione viene considerato positivo se risulta visualizzabile su gel la banda della dimensione attesa; tale banda è di 210 paia di basi (pb).

Verificare che tutti i controlli manifestino il comportamento sotto riportato per poter considerare valida la prova

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 13 di 14
---------------------	---	--

CONTROLLO	ESITO
Controllo negativo di RT	-
Controllo negativo di estrazione	-
Controllo negativo di PCR	-
Controllo negativo di <i>seminested</i> PCR	-
Controllo positivo di estrazione	+
Controllo positivo di PCR	+

Se i risultati dei controlli differiscono da quanto riportato sopra è necessario ripetere la prova a partire dalla fase in cui si è verificata l'anomalia.

Modalità di espressione:

PROVA: Virus Epatite A (HAV): agente eziologico

TECNICA: PCR

METODO DI PROVA: MP 09/180 Rev 1

Non dimostrata presenza

Dimostrata presenza

13. CARATTERISTICHE DEL METODO (PERFORMANCE)

PROTOCOLLO DI STUDIO E VALIDAZIONE (PSV) – REPORT DI VALIDAZIONE (RV)

PSV 09/180 REV. 0 RV 09/180 REV. 0

PARAMETRI DI VALIDAZIONE

Determinazione del LOD

MATRICE	LOD
Acqua	10 ⁰ TCID ₅₀ /ml
Feci	10 ⁰ TCID ₅₀ /ml
Piatti pronti	10 ² TCID ₅₀ /ml
Insalata	10 ⁰ TCID ₅₀ /ml
Frutti di bosco	10 ¹ TCID ₅₀ /ml

Determinazione delle percentuali di falsi positivi e falsi negativi

CATEGORIA	MATRICE	PERCENTUALI	
		% FALSI POS	% FALSI NEG
ACQUA	ACQUA IN BOTTIGLIA	0	0
FECI	FECI	0	3,4
PIATTI PRONTI	PASTA FRESCA	0	3,4
VEGETALI	INSALATA	0	7
	FRUTTI DI BOSCO	0	0

Determinazione dell'esclusività

100%

INCERTEZZA DEI RISULTATI

Non applicabile

14. RIFERIMENTI

a) Riferimenti interni

- PG 00/015 Norme generali di comportamento e sicurezza in laboratorio
- PG 00/016 Tipologie e modalità di smaltimento dei rifiuti nell'Istituto
- PG 00/023 Contenuto e gestione dei rapporti di prova
- PG 00/106 Gestione dei materiali utilizzati come controlli positivi nei metodi PCR
- PG 00/107 Organizzazione delle aree, delle attività e controlli per l'esecuzione delle prove PCR

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN ALIMENTI, ACQUA E CAMPIONI BIOLOGICI MEDIANTE <i>seminested</i> PCR	MP 09/180 REV 1 Data emissione 12 SET. 2013 Pag. 14 di 14
--------------	---	--

b) Riferimenti esterni

- Croci L., D. De Medici, G. Morace, A. Fiore, C. Scalfaro, F. Beneduce e L. Toti. 1999. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. Intern. J. Food Microbiol. 48: 67-71.
- Cromeans T.L., O.V. Nainan e H. Margolis. 1997. Detection of Hepatitis A Virus RNA in Oyster Meat. Appl. Environ. Microbiol. 63 (6): 2460-2463.
- Dubois E., Agier C., Traoré O., Hennechart C., Merle G., Crucièrè C., Laveran H., (2002), Modified Concentration Method for Detection of Enteric Viruses on Fruits and Vegetables by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction or Cell Culture, Journal of Food Protection, Vol 65, No. 12, 1962-1969.
- Le Guyader F., E. Dubois, D. Menard e M. Pommepuy. 1994. Detection of Hepatitis A Virus, Rotavirus and Enterovirus in Naturally Contaminated Shellfish and Sediment by Reverse Transcription-Seminested PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60 (10): 3665-3671.
- Sambrook J, E.F. Fritsch e T. Maniatis. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sansebastiano G., Bellelli E. (1980). Sulla concentrazione dei virus nelle acque con il metodo delle membrane filtranti. L'igiene moderna, Vol. LXXIV, n. 5, Novembre, 760-790.
- Sansebastiano G., Cesari C., Zilioli F. (1988). Sulla concentrazione dei virus nelle acque con filtri di fibra di vetro a cartuccia. Tecnica sanitaria e medicina di comunità, Vol. XXVI, n. 3, Maggio-Giugno, 197-209.

15. AFFIDAMENTO A TERZI DELLA FASE DI PROVA

Non previsto.

16. ALLEGATI

Non previsti

COPIA PER MINISTERO DELLA SALUTE