

IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di Giardia duodenalis MEDIANTE MULTIPLEX PCR

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	2
4	DEFINIZIONI	3
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	3
6	REATTIVI E MATERIALI	4
6.1	Reattivi e materiali per il protocollo di estrazione A	4
6.2	Reattivi e materiali per il protocollo di estrazione B	4
6.3	Reattivi e materiali per le successive fasi	5
7	PROCEDIMENTO	6
7.2.1	<i>Estrazione del DNA dal campione fecale da sottoporre al test (Protocollo A)</i>	6
7.2.2	<i>Estrazione del DNA dal campione fecale da sottoporre al test (Protocollo B)</i>	7
7.2.3	<i>Amplificazione PCR</i>	8
7.2.4	<i>Visualizzazione dei risultati</i>	9
7.2.5	<i>Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR</i>	10
7.2.6	<i>Verifica della presenza di inibitori tramite PCR</i>	11
7.2.7	<i>Visualizzazione dei risultati</i>	11
7.2.8	<i>Interpretazione dei risultati</i>	11
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	12
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	12
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	12

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo di prova interno per determinare, mediante PCR, la presenza di *Giardia duodenalis* appartenenti ai due distinti taxa genetici, definiti assemblaggi A e B, che infettano l'uomo e gli animali. Il metodo può essere applicato a campioni di feci di origine umana ed animale già diagnosticate positive per la presenza di cisti e/o trofozoiti di *Giardia*. Gli assemblaggi A e B sono gli unici in grado di infettare l'uomo, quindi il metodo è specificamente pensato per la diagnosi della giardiasi umana e per l'identificazione del potenziale rischio zoonotico in campioni animali.

2 PRINCIPIO DEL METODO

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici specifici dei quali si conoscono la sequenza nucleotidica iniziale e terminale (coppia di oligonucleotidi). Se una specie o una sottospecie o una popolazione di una specie possiede una porzione di DNA caratteristica, per composizione e/o dimensione, è possibile scegliere una coppia di oligonucleotidi che ne permetta la sua amplificazione selettiva. L'amplificazione PCR è caratterizzata da alta sensibilità e specificità. La PCR multiplex prevede l'utilizzo simultaneo di più coppie di oligonucleotidi per generare amplificati di diversa grandezza da varianti diverse di un medesimo gene.

I protozoi parassiti del genere *Giardia* infettano la porzione superiore dell'intestino dei vertebrati, compreso l'uomo. Il ciclo vitale del parassita consta di una fase vegetativa, il trofozoita dotato di flagelli e binucleato, in grado di riprodursi per scissione binaria all'interno dell'intestino dell'ospite, e di una fase di resistenza ambientale, la cisti, espulsa con le feci ed in grado di propagare l'infezione. In seguito all'ingestione da parte di un nuovo ospite, la cisti si schiude liberando due trofozoiti in grado di colonizzare l'intestino. Nove specie sono state identificate in base alla specificità d'ospite, alla morfologia ed al fenotipo: *Giardia agilis* negli anfibi, *G. varani* nei sauri, *G. muris* e *G. microti* nei roditori, *G. cricetarum* nei cricetidi, *G. peramelis* nel quenda, *G. ardeae* e *G. psittaci* negli uccelli e *G. duodenalis* (sinonimi: *G. lamblia*; *G. intestinalis*) nei mammiferi. *Giardia duodenalis* è l'agente eziologico della giardiasi, ed è l'unica specie in grado di infettare sia l'uomo che altri mammiferi, compresi animali d'allevamento e da compagnia. *Giardia duodenalis* risulta suddivisa in otto ~~sette~~ assemblaggi (A-H), indistinguibili a livello morfologico, ma identificabili in base all'analisi genetica. Mentre gli assemblaggi A e B sono frequentemente isolati dall'uomo e da un ampio spettro di altri mammiferi, i restanti assemblaggi (C-H) risultano avere una spiccata specificità d'ospite e infettano l'uomo sporadicamente (Monis et al., 1999, Monis et al., 2003; Sulaiman et al., 2003; Ryan et al., 2021; Wielinga et al., 2023).

I metodi molecolari basati sulla PCR hanno permesso di identificare a livello di assemblaggio le cisti di *G. duodenalis* presenti in campioni fecali di origine umana ed animale. Il metodo utilizzato si basa sull'amplificazione di una porzione del locus genetico 4E1-HP che produce due prodotti di PCR di grandezza differente, in dipendenza dell'assemblaggio presente nel campione e quindi distinguibili attraverso analisi elettroforetica.

In tabella A sono visibili le dimensioni dei frammenti del locus 4E1-HP prodotti mediante amplificazione con le due coppie di oligonucleotidi specifici.

Tabella A. Dimensione dei prodotti di amplificazione (in paia di basi) della sequenza 4E1-HP attesi per ogni assemblaggio

Assemblaggio A	Assemblaggio B
165	272

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L. (1999) Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol. 16, pp. 1135-1144.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L. (2003) Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect Genet Evol. 3, pp. 29-38.

Ryan, UM, Feng, Y, Fayer, R, Xiao, L. (2021) Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50 year perspective (1971-2021). Int J Parasitol. 51(13-14):1099-1119

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L. (2003) Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis. 9, pp. 1444-1452.

Vanni I, Cacciò SM, van Lith L, Lebbad M, Svard SG, et al. (2012) Detection of *Giardia duodenalis* Assemblages A and B in Human Feces by Simple, Assemblage-Specific PCR Assays. PLoS Negl Trop Dis 6(8): e1776.

Wielinga, C, Williams, A, Monis, P, Thompson, RCA. (2023) Proposed taxonomic revision of *Giardia duodenalis*. Infect Genet Evol. 111:105430.

UNI EN ISO 22174: 2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni negli alimenti – requisiti generali e definizioni.

UNI EN ISO 20837:2006. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti Requisiti per la preparazione del campione per la ricerca qualitativa.

UNI EN ISO 20838:2006. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti Requisiti per l'amplificazione e la ricerca per metodi qualitativi.

Qiagen: QIAamp Fast DNA Stool Handbook.

4 DEFINIZIONI

4E1-HP, locus genetico corrispondente ad una sequenza codificante per una proteina ipotetica che presenta un'elevata variabilità fra l'assemblaggio A e l'assemblaggio B di *G. duodenalis*.

Oligonucleotide, breve sequenza (15/30 basi nucleotidiche) utilizzata per amplificare un frammento specifico di DNA.

Set 11, miscela di 4 oligonucleotidi che amplificano un frammento del locus 4E1-HP in *G. duodenalis*.

Controllo positivo di estrazione, aliquote di campioni fecali contenenti cisti di *G. duodenalis*, assemblaggio A o B, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA.

Controlli positivi di amplificazione, DNA genomici purificati da trofozoiti di *G. duodenalis* assemblaggi A e B, oppure da trofozoiti di *G. duodenalis*, assemblaggi A e B, provenienti da coltura in vitro. Sono utilizzati nelle sessioni di amplificazione per verificare l'efficienza del sistema PCR.

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente. È utilizzato negli esperimenti di amplificazione per verificare l'assenza di contaminazioni del sistema PCR.

Nel presente documento sono inoltre utilizzate le definizioni e la terminologia della norma UNI EN ISO 22174.

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

Centrifuga da banco per provette da 1,5-2,0 mL, min 20000 x g

Congelatore, temperatura ≤ -15°C

Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C

Termociclatore per PCR

Frigorifero, 1-8°C

Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente

Sistema per acquisizione di immagini

Micropipette (1-10 µL, 2-20 µL, 20-100 µL, 50-200 µL e 200-1000 µL)

Sistema di produzione di acqua di grado reagente o Milli Q

Agitatore Vortex

Bilancia analitica risoluzione 0,1 g

Transilluminatore UV

Agitatore orbitante

Qiaxcel, sistema di elettroforesi verticale capillare

Omogeneizzatore vibrante da banco per provette (tipo, FastPrep Instrument)

Agitatore a ruota per provette

6 REATTIVI E MATERIALI

6.1 Reattivi e materiali per il protocollo di estrazione A

InhibitEX Buffer. Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Proteinasi K. Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Tampone di lisi. Soluzione reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, e identificata dal produttore come soluzione 'AL'. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Etanolo assoluto. Reagente reperibile in commercio. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Colonna di recupero. Materiale reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come QIAamp Mini Spin Columns.

Provetta di raccolta. Materiale reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come Collection tubes (2 ml).

Tamponi di lavaggio. Soluzioni reperibili in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Preparare secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla 'AW1' e 'AW2'. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Tampone di eluizione. Soluzione reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come Buffer AE. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.2 Reattivi e materiali per il protocollo di estrazione B

Provetta per la lisi. Provetta con tappo a vite e contenente biglie di varie dimensioni (tipo, Lysis Matrix E tube, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals) reperibili in commercio.

Tampone di risospensione. Soluzione contenente sodio fosfato reperibile in commercio (tipo Sodium Phosphate Buffer, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare secondo le specifiche del produttore.

Tampone di omogeneizzazione. Soluzione reperibile in commercio (tipo Tampone MT, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare a temperatura ambiente.

Tampone di lisi. Soluzione reperibile in commercio (tipo Tampone PPS, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare a temperatura ambiente.

Resina di Silice. Soluzione reperibile in commercio (tipo Binding Matrix, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Conservare a temperatura ambiente.

Colonna di recupero. Materiale reperibile in commercio (tipo FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals, ed identificata dal produttore come "SPIN filter").

Tampone di lavaggio. Soluzione reperibile in commercio (tipo FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals). Preparare secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla 'SEWS-N'. Conservare a temperatura ambiente.

Provetta di raccolta. Provetta da 2 mL reperibile in commercio (tipo FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals, ed identificata dal produttore come “catch tube”).

Tampone di eluizione. Soluzione reperibile in commercio (tipo, FastDNA Spin kit for Soil, MP Biochemicals, e identificata dal produttore come DES). Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.3 Reattivi e materiali per le successive fasi

PCR Master Mix. Soluzione reperibile in commercio adatta alla conduzione di esperimenti di amplificazione PCR (per esempio: Qiagen HotStarTaq Master Mix Kit). Conservare secondo le specifiche del produttore. Nel caso si utilizzi una confezione di grande volume il prodotto viene dispensato in aliquote da 1-2 mL, mantenute secondo le specifiche di conservazione della confezione di origine.

Oligonucleotidi. Preparazione commerciale. Il prodotto liofilizzato viene ricostituito secondo le indicazioni del produttore ad una concentrazione di 100 pmoli/μL con acqua di grado analitico. L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore fino ad un massimo di 20 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore fino ad un massimo di 10 anni.

Set 11. Miscela di oligonucleotidi utilizzata per la PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume da una soluzione 10 pmoli/μL di ciascuno degli oligonucleotidi 4E1-HP A For, 4E1-HP A rev, 4E1-HP B For e 4E1-HP B Rev (tabella B). La quantità finale corrisponde a 10 pmoli di ciascun oligonucleotide nella miscela di amplificazione. Aliquote di 100 μL vengono preparate e conservate in congelatore fino a un massimo di 10 anni.

Tabella B. Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il Set11 (6.11),
relativi codici e regione genomica amplificata

Sequenza oligonucleotidi	Codice	Regione genomica amplificata
5'-AAAGAGATAGTTCGCGATGTC-3'	4E1-HP A For	4E1-HP
5'-ATTAACAAACAGGGAGACGTATG-3'	4E1-HP A Rev	
5'-GAAGTCATCTCTGGGGCAAG-3'	4E1-HP B For	
5'-GAAGTCTAGATAAACGTGTCCG-3'	4E1-HP B Rev	

Loading buffer, prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA; può essere incluso nella soluzione PCR Master Mix di cui al punto 6.9. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Agaroso, prodotto commerciale definito adatto alla conduzione di elettroforesi per molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.

TAE soluzione 50x, prodotto commerciale (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8,2–8,4 a 25°C). Conservare secondo le specifiche del produttore.

TAE soluzione 1x, preparazione di 1000 mL: prelevare 20 mL dalla soluzione 50x e portare il volume a 1000 mL con acqua distillata. Preparare al momento dell'uso.

Intercalante del DNA - prodotto commerciale in grado di inserirsi nei filamenti di DNA. Utilizzato per visualizzare i prodotti di amplificazione su gel di agaroso.

L50, ladder 50, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 50 bp nel range 50-500 bp. Conservare in frigorifero secondo le specifiche del produttore.

Acqua grado reagente o Milli-Q, o acqua DNAsi free fornita nel kit di PCR.

Campione fecale di riferimento, campioni fecali contenenti cisti di *G. duodenalis*, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA. Conservare in congelatore fino ad un massimo di 10 anni.

DNA di riferimento: DNA genomici estratti da campioni fecali contenenti cisti di *G. duodenalis*,

assemblaggi A e B, oppure da trofozoiti di *G. duodenalis*, assemblaggi A e B, provenienti da coltura in vitro. Conservare in congelatore fino ad un massimo di 10 anni.

QIAxcel high resolution kit: prodotto commerciale della Qiagen. Include cartucce di separazione e soluzioni per la preparazione e per la corsa dei campioni da analizzare. Conservare i singoli componenti secondo le specifiche del produttore.

Alignment marker: prodotto commerciale della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.

DNA size marker: prodotto commerciale della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Verifica del campione di prova

Prima di procedere con l'analisi del campione, viene verificata l'integrità delle provette contenenti i campioni da analizzare; le provette devono essere integre, le feci devono essere in etanolo e non vi deve essere traccia di perdita del contenuto.

Qualora l'operatore non reputi che il campione di prova sia idoneo all'esecuzione del test, il test stesso non viene eseguito.

7.2 Esecuzione della prova

L'estrazione del DNA dalla larva da sottoporre a prova può essere effettuata con due protocolli alternativi identificati di seguito come Protocollo A e Protocollo B.

7.2.1 Estrazione del DNA dal campione fecale da sottoporre al test (Protocollo A)

Se non diversamente specificato, la procedura viene eseguita a temperatura ambiente.

Ogni sessione di prova prevede che un campione fecale di riferimento venga sottoposto alla procedura di estrazione e identificato come 'controllo positivo di estrazione'.

Nota bene: il materiale fecale di riferimento, conservato in etanolo al 50%, prevede la rimozione dell'etanolo con una centrifugata a 5000 x g per 5 minuti e la risospensione del pellet fino a 200 µL con acqua grado reagente, si procede poi come indicato nel punto "b".

- a) Trasferire 200 µL di campione fecale in provette da 2 mL preventivamente marcate con l'opportuno codice identificativo.
- b) Aggiungere 1 mL di InhibitEX buffer e vortexare 1 minuto per omogeneizzare il campione.
- c) Incubare per 10 minuti a 95°C in termoblocco. Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- d) Centrifugare per 1 minuto a 12000 x g
- e) Porre 25 µL di proteinasi K in una provetta da 1,5 mL.
- f) Trasferire 600 µL del sopranatante (punto "d") nella provetta contenente proteinasi K (punto "e").
- g) Aggiungere 600 µL di tampone di lisi, buffer AL e vortexare per 15 secondi.
- h) Incubare a 70°C per 10 minuti in termoblocco.
- i) Aggiungere 600 µL di etanolo assoluto e vortexare brevemente.
- j) Per ogni campione, posizionare una colonna di recupero in una provetta di raccolta.
- k) Trasferire 600 µL di lisato (punto "i") nella colonna di recupero e centrifugare per 1 minuto a 12.000 x g.
- l) Eliminare il tubo di raccolta e posizionare la colonna di recupero in una nuova provetta di raccolta.
- m) Ripetere i punti da "k" a "l" altre due volte fino ad esaurimento del lisato punto "k".
- n) Aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio AW1 alla colonna di recupero e centrifugare per 1 minuto a 12.000 x g.
- o) Eliminare la provetta di raccolta e posizionare la colonna di recupero in una provetta di raccolta pulita.

- p) Aggiungere 500 μ L di tampone di lavaggio AW2 alla colonna di recupero e centrifugare per 3 minuti a 12.000 x g.
- q) Centrifugare di nuovo la provetta con la colonna di recupero a 12000 x g per 2 minuti, senza aggiungere altro liquido.
- r) Trasferire la colonna di recupero all'interno di una nuova provetta da 1,5 mL.
- s) Aggiungere 100 μ L di tampone di eluizione ATE alla colonna di recupero ed incubare per 1-2 minuti.
- t) Centrifugare per 1 minuto a 12.000 x g, eliminare la colonna di recupero, conservando la provetta contenente il DNA estratto.
- u) Il DNA così preparato viene definito 'DNA/campione fecale' e conservato in congelatore. In tali condizioni può essere conservato fino a 10 anni.

7.2.2 Estrazione del DNA dal campione fecale da sottoporre al test (**Protocollo B**)

Se non diversamente specificato, la procedura viene eseguita a temperatura ambiente.

Ogni sessione di prova prevede che il campione fecale di riferimento venga sottoposto alla procedura di estrazione e identificato come 'controllo positivo di estrazione'.

Nota bene: il materiale fecale di riferimento, conservato in etanolo al 50%, prevede la rimozione dell'etanolo con una centrifugata a 5000g per 5 minuti e la risospensione del pellet con 400 μ L di acqua grado reagente, si procede poi come indicato nel punto "a".

- a) Trasferire 450 μ L del campione fecale in una provetta per la lisi.
- b) Aggiungere 978 μ L di tampone di risospensione e 122 μ L di tampone di omogeneizzazione.
- c) Omogenizzare il campione mediante omogeneizzatore vibrante da banco a velocità 6 per 40 secondi.
- d) Centrifugare la provetta a 12000g per 10 minuti.
- e) Trasferire la fase liquida in una provetta da 2 mL e aggiungere 250 μ L di tampone di lisi, miscelare invertendo la provetta per 10 volte.
- f) Centrifugare la provetta a 12000 x g per 5 minuti.
- g) Nel frattempo, agitare su vortex per 30 sec la resina di silice.
- h) Trasferire la fase liquida, ottenuta dopo centrifugazione (punto "f"), in una nuova provetta da 5 mL o 15 mL, aggiungere 1 mL di resina di silice e miscelare in agitatore a ruota, o invertendo la provetta a mano, per 2 minuti.
- i) Collocare la provetta in porta-provette per 3 minuti per permettere la sedimentazione della resina di silice.
- j) Rimuovere delicatamente 500 μ L di soprannatante facendo attenzione a non disturbare la resina di silice.
- k) Risospendere la resina di silice con il soprannatante rimasto, utilizzando una micropipetta.
- l) Trasferire 600 μ L della miscela in una colonna di recupero alloggiata in provetta di raccolta.
- m) Centrifugare la provetta con la colonna di recupero a 12000 x g per 1 minuto.
- n) Vuotare la provetta di raccolta.
- o) Ripetere i punti da "l" a "n" fino al completo trasferimento di tutta la resina di silice nella colonna di recupero.
- p) Aggiungere 500 μ L tampone di lavaggio alla colonna di recupero e delicatamente risospendere la resina con la micropipetta.
- q) Centrifugare la provetta con la colonna di recupero a 12000 x g per 1 minuto.
- r) Vuotare la provetta di raccolta.
- s) Centrifugare di nuovo la provetta con la colonna di recupero a 12000 x g per 2 minuti, senza aggiungere altro liquido.
- t) Trasferire la colonna di recupero in una nuova provetta di raccolta.
- u) Lasciare asciugare all'aria per 5 minuti.
- v) Risospendere delicatamente la resina in 100 μ L di tampone di eluizione con la micropipetta.

- w) Incubare a 55°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) per 5 minuti in termoblocco.
- x) Centrifugare a 12000 x g per 1 minuto, eliminare la colonna di recupero, conservare la provetta contenente il DNA.
- y) Gli estratti così preparati vengono definiti 'DNA/campione fecale' e conservati in congelatore. In tali condizioni possono essere conservati fino a 10 anni

7.2.3 Amplificazione PCR

Dove non espressamente indicato mantenere le provette in ghiaccio o in supporto refrigerante, utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è previsto l'utilizzo di un controllo di estrazione, due controlli positivi di amplificazione, ovvero DNA di riferimento di *G. duodenalis* e di un controllo negativo, ovvero acqua, per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l'utilizzo di una PCR Master Mix a concentrazione 2x, in caso di concentrazione diversa modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongellare: DNA/campioni fecali, PCR Master Mix, Set 11 e controlli positivi di amplificazione.
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 mL.
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella D) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 3 o 4 unità (un controllo positivo di estrazione, uno o due controlli positivi di amplificazione, corrispondenti agli assemblaggi A e B, e un controllo negativo

Tabella D. Miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

2x PCR MasterMix	25 μL
H ₂ O	16 μL
Set11	4 μL
Totale	45 μL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 45 μL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto 'b').
- f) Aggiungere in ogni provetta 5 μL di preparazione di DNA/campione fecale da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (Tabella E) del termociclatore, aspettare che la temperatura raggiunga 94°C e, dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.

Nota bene: Nel caso di Taq-DNA Polimerasi di tipo "hot start" (per esempio HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen) seguire le indicazioni del produttore per l'attivazione dell'enzima (es. 15 min a 95°C).

Tabella E. Ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale #	5 min/94°C
Amplificazione	30 s/94°C 30 s/56°C 30 s/72°C
Numero di cicli	40
Estensione finale	7 min/72°C

La durata della denaturazione iniziale può variare, verificare le specifiche del produttore della PCR Master Mix

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.4 Visualizzazione dei risultati

- a) Accendere lo strumento Qiaxcel ed il relativo software di gestione Qiaxcel ScreenGel sul PC collegato.
- b) Accedere al pannello "Process Profile"; indicare "DNA HighRes" alla voce "Cartridge Type"; indicare il profilo e l'Experiment Directory desiderati.
- c) Spostare il carrello porta provette in "posizione di accesso" selezionando la voce "Load Position" dal pannello "Status Information".
- d) Inserire nella posizione MARKER1 le 12 provette contenenti almeno 10 µL (volume minimo) di "Alignment Marker" prescelto e riportare il carrello nella posizione iniziale selezionando la voce "Park Position" dal pannello "Status Information".
- e) Posizionare i campioni da analizzare (volume minimo 10 µL) per file complete da 12 a partire dalla riga "A". Qualora i campioni da analizzare non fossero in numero sufficiente a completare la fila da 12, aggiungere un opportuno numero di provette contenenti il QX DNA dilution buffer (volume minimo 10 µL) in dotazione con il QIAxcel DNA High Resolution kit.
- f) Per ogni round di analisi (che può comprendere fino ad un massimo di 8 corse da 12 campioni) includere una provetta contenente il DNA size marker.
- g) In "Run Parameters" impostare l'opzione 0M500 alla voce "Method"; selezionare le corse occupate da campioni sulla piastra virtuale nel pannello laterale "Sample Row Selection".
- h) In "Sample Selection" impostare i parametri di corsa come segue:
"Plate ID": inserire il codice del primo e dell'ultimo dei campioni presenti nella piastra.
"Alignment Marker": selezionare l'alignment marker prescelto.
- i) In "Sample Information" lasciare in bianco o in alternativa inserire i nomi dei singoli campioni nelle caselle corrispondenti.
- j) In "Run Check" verificare che tutte le righe selezionate siano occupate da provette contenenti prodotti di PCR da analizzare o QX DNA dilution buffer e che il Marker di allineamento sia stato caricato, quindi spuntare le caselle apposite; infine selezionare "Run".
- k) Visualizzare le corse selezionando la modalità "Absolute migration time" dal menù "Image options" e processare i dati con il comando "Start analysis".
- l) Scorrere gli elettroferogrammi dei singoli campioni per verificare la presenza di picchi al di sopra della banda più alta del marker di allineamento. Eliminare i picchi inferiori e superiori a quelli del marker di allineamento. Al termine di questa operazione riprocessare i dati con il comando "reprocess" del menu "Analysis"
- m) Stampare il risultato della corsa elettroforetica
- n) Chiudere il programma e spegnere lo strumento.

Se lo strumento Qiaxcel è fuori servizio per un periodo prolungato procedere con elettroforesi su gel di agarosio seguendo il protocollo di seguito riportato:

- a) Assemblare l'apparato per elettroforesi seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- b) Pesare 2 g di agarosio e versarlo in 100 mL di TAE 1x (concentrazione finale agarosio 2%) preparato in un contenitore di vetro.
- c) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione e pesare la soluzione con tutto il contenitore di vetro.
- d) Portare la sospensione di agarosio ad ebollizione per circa 30 sec. Se all'ispezione visiva la soluzione non appare omogenea continuare la fase di ebollizione per altri 30 sec.
- e) Reintegrare il liquido evaporato con acqua fino al peso precedente all'ebollizione.
- f) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- g) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere l'intercalante del DNA secondo le specifiche del produttore.

- h) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente l'intercalante del DNA e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato in precedenza (punto a).
- i) Aspettare che il gel solidifichi; non meno di 30 minuti.
- j) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- k) Coprire il gel con tampone TAE 1x.
- l) Miscelare 10 μ L del prodotto di amplificazione (7.2.3 punto i) con loading buffer secondo le specifiche del produttore, se non presente nella PCR Master Mix utilizzata.
- m) Caricare in ogni pozzetto 10 μ L di ogni campione seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (7.2.3 punto b).
- n) Caricare il primo e l'ultimo pozzetto con 10 μ L della soluzione L50.
- o) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore e impostare un valore di tensione di 10 V/cm di gel.
- p) Applicare il campo elettrico per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer non raggiunge 1 cm dal bordo del gel.
- q) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di pesi molecolari compresi tra 100 e 500 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto tensione fino ad avere una separazione adeguata.
- r) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema per acquisizione di immagini ed effettuare una stampa del risultato.

7.2.5 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) Il/i controllo/i positivo/i di amplificazione mostra/mostrano un prodotto di amplificazione in accordo con la tabella A;
- ii) il controllo negativo di amplificazione non mostra prodotti di amplificazione o eventualmente solo bande riferibili agli oligonucleotidi inutilizzati e/o a loro derivati (primer dimer);
- iii) il controllo positivo di estrazione produce un prodotto di amplificazione in accordo con la tabella A.

Nell'analisi dei dati vengono prese in considerazione solo le bande che soddisfano i seguenti requisiti:

- 1) dimensioni superiori a 50 bp;
- 2) comprese all'interno delle due bande dell'Alignment marker;
- 3) intensità del picco di emissione superiore ad un valore soglia del 5%.

Nel caso siano presenti picchi di emissione sovrapposti viene preso in considerazione solo quello con valore maggiore, se i valori sono simili il campione viene scartato.

La dimensione del prodotto di amplificazione viene valutata nei seguenti modi:

- i) comparazione visiva della banda con i pesi molecolari del "DNA size marker" e con i controlli positivi di estrazione ed amplificazione sul gel virtuale;
- ii) confronto tra le dimensioni della banda ottenuta calcolata dal software dello strumento con la dimensione attesa.

Le dimensioni delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi su gel di agarosio vengono valutate per comparazione delle stesse (vedi tabella A) con i pesi molecolari di riferimento DNA size marker e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

Le dimensioni delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi vengono valutate per comparazione delle stesse (vedi Tabella A) con i pesi molecolari di riferimento L50 e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

7.2.6 Verifica della presenza di inibitori tramite PCR

Qualora un campione di prova mostri una o più bande non in accordo con la tabella A o non mostri alcuna amplificazione, occorre escludere la possibilità che la reazione di PCR sia stata inibita da sostanze presenti nel materiale fecale di partenza. Per fare ciò, DNA di riferimento verrà miscelato con il DNA/campione fecale (7.2.1 punto “u”-protocollo A- oppure 7.2.2 punto “y”-protocollo B-) e amplificato secondo quanto descritto nel presente paragrafo allo scopo di escludere la presenza di inibitori.

Dove non espressamente indicato le provette sono mantenute in ghiaccio o in supporto refrigerante. Dove non espressamente indicato utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è previsto l'utilizzo di un controllo positivo, costituito da DNA di riferimento, per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l'utilizzo di una PCR Master Mix a concentrazione 2x. In caso di una diversa concentrazione, modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- Scongela: DNA/campioni fecali, 2x PCR MasterMix, Set11, controllo positivo di amplificazione.
- Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 mL.
- Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella F) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 2 unità (una per il controllo positivo, una per il controllo negativo di amplificazione).

Tabella F – *miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi*

2x PCR MasterMix	25 µL
H ₂ O	14 µL
Set11	1 µL
DNA di controllo	5 µL
Totale	45 µL
7 Totale	45 µL

- Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e, se necessario, centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- Trasferire 45 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto “b”).
- Aggiungere in ogni provetta 5 µL del DNA/campione fecale da analizzare (7.2.1 punto “u”-protocollo A- oppure 7.2.2 punto “y”-protocollo B-), nel controllo positivo aggiungere 5 µL di acqua.
- Chiudere le provette, e centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- Avviare il ciclo di amplificazione del termociclatore, secondo il programma descritto in Tabella E al paragrafo 7.2.3. Aspettare che la temperatura raggiunga 95°C e dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.
- Finita la fase di amplificazione centrifugare le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.7 Visualizzazione dei risultati

Per la visualizzazione dei risultati, seguire la procedura descritta ai punti 7.2.3.

7.2.8 Interpretazione dei risultati

Qualora si osservi l'amplificazione del frammento specifico di 165 o 272 paia di basi, in base al DNA di riferimento utilizzato, la presenza di inibitori verrà esclusa ed il DNA/campione fecale verrà giudicato “negativo”, il risultato della prova sarà espresso come “assemblaggio non determinabile”.

Qualora non si osservi l'amplificazione del frammento specifico del DNA di riferimento utilizzato si procederà ad una nuova estrazione del DNA a partire dal campione di prova. Se anche l'amplificazione del DNA nuovamente estratto dal campione di prova non genera la banda di amplificazione attesa, il

risultato sarà espresso come “assemblaggio non determinabile”.

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Esprimere i risultati nel rapporto di prova secondo le seguenti modalità:

Se la banda di amplificazione è associabile a 165 bp, il campione viene considerato positivo per *G. duodenalis* assemblaggio A. Se la banda di amplificazione è associabile a 272 bp, il campione viene considerato positivo per *G. duodenalis* assemblaggio B. Se si osservano 2 bande di amplificazione, una associabile a 165 bp e una a 272 bp, il campione viene considerato positivo per *G. duodenalis* assemblaggio A+B (infezione mista).

Qualora il test risulti valido ed il campione analizzato mostri bande di amplificazione non classificabili tra quelle presenti in tabella A, il campione viene definito ‘negativo’.

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. I risultati sono stati utilizzati per confermare che il metodo è adatto allo scopo previsto e sono riportati nel relativo fascicolo di validazione, al quale si rimanda.

10 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il presente metodo di prova può essere eseguito solo da personale autorizzato.

I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso e camice.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori, sia per la manipolazione che per la gestione dei rifiuti, fare riferimento ai manuali emessi dal *Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro* dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e visionabili sul sito: <https://lfintranet.iss.it/web/guest/spp-sistema-di-gestione-della-salute-e-sicurezza>.