


 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 1 di 13
--	---	--

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	3
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	3
6	REATTIVI E MATERIALI	4
7	PROCEDIMENTO	6
	7.1 Verifica del campione di prova	6
	7.2 Esecuzione della prova	6
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	12
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	12
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	12

Redazione	Verifica		Approvazione	Data
Responsabile di Sezione	Responsabile Assicurazione Qualità	Direttore	Direttore	
sRSM  Fabio Corini	 Alessia Rossetti	 M. Corini	 M. Corini	13/05/2019
Descrizione delle modifiche: inserimento termine multiplex nel titolo; kit estrazione del DNA, tempo di conservazione degli oligonucleotidi e dei materiali di riferimento; inserimento elettroforesi capillare.				

 <p>Dipartimento MI</p>	<p style="text-align: center;">METODO DI PROVA</p> <p style="text-align: center;">IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR</p> <p style="text-align: center;">Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p style="text-align: center;">MI-11</p> <p style="text-align: center;">Rev. 1</p> <p style="text-align: center;">Pag. 2 di 13</p>
--	---	---

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 l'intestino tenue dei vertebrati, compreso l'uomo. Il ciclo vitale del parassita consta di una fase vegetativa binucleata, il trofozoita, dotata di flagelli e in grado di riprodursi per scissione binaria all'interno dell'intestino dell'ospite, e di una fase di resistenza, 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 cellule in grado di colonizzare l'intestino. Sei specie sono state identificate in base alla specificità d'ospite, alla morfologia ed al fenotipo: *Giardia agilis* negli anfibi, *G. muris* e *G. microti* nei roditori, *G. ardeae* e *G. psittaci* negli uccelli e *G. duodenalis* (sinonimi: *G. lamblia*, *G. intestinalis*) nei mammiferi. *G. 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. *G. duodenalis* risulta suddivisa in sette assemblaggi (A-G), indistinguibili a livello morfologico, ma identificabili in base all'analisi genetica. Gli assemblaggi A e B sono gli unici zoonotici, potendo infettare anche l'uomo oltre ad altri mammiferi. I restanti assemblaggi (C-G) risultano avere una maggiore specificità d'ospite e non infettano l'uomo (Monis et al., 1999, Monis et al., 2003; Sulaiman et al., 2003).

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

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 3 di 13
--	---	--

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.

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.

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 feci contenenti cisti di *G. duodenalis*, assemblaggio A, 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* ceppo WB (assemblaggio A) e ceppo GS (assemblaggio B). Sono utilizzati nelle sessioni di amplificazione per verificare l'efficienza del sistema PCR.

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente. E' 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

- 5.1 Centrifuga ~~refrigerata~~ da banco per provette da 1,5-2,0 mL, min 20000 x g
- 5.2 Congelatore, temperatura ≤ -15°C
- 5.3 Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C
- 5.4 Termociclatore per PCR
- 5.5 Frigorifero, 1-8°C
- 5.6 Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente
- 5.7 Sistema per acquisizione di immagini
- 5.8 Micropipette (1-10 µL, 2-20 µL, 20-100 µL, 50-200 µL e 200-1000 µL)
- 5.9 Sistema di produzione di acqua di grado analitico (min 18M Ω/cm)

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 4 di 13
--	---	--

- 5.10 Agitatore Vortex
- 5.11 Bilancia analitica risoluzione 0,1 g
- 5.12 Transilluminatore
- 5.13 Agitatore orbitante
- 5.14 Qiaxcel, sistema di elettroforesi verticale capillare

6 REATTIVI E MATERIALI

- ~~6.1 **Tampone di lisi.** Soluzione reperibile in commercio: QIAamp DNA Stool Handbook, e identificata dal produttore come soluzione 'ASL'. Conservare secondo le specifiche del produttore.~~
- 6.1 **InhibitEX Buffer.** Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.2 **Proteinasi K.** Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.3 **Tampone di lisi.** Soluzione reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, e identificata dal produttore come soluzione 'AL'. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.4 **Etanolo assoluto.** Reagente reperibile in commercio. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.5 **Colonna di recupero.** Materiale reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come QIAamp Mini Spin Columns.
- 6.6 **Provetta di raccolta.** Materiale reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come Collection tubes (2 ml).
- 6.7 **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.
- 6.8 **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.
- 6.9 **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.
- 6.10 **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 (5.9). L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore (5.2) fino ad un massimo di 20 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore (5.2) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.11 **Set 11.** Miscela di oligonucleotidi (6.11) 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 (5.2) fino a un massimo di 10 anni.


 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 5 di 13
--	---	--

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' 5'-ATTAACAAACAGGGAGACGTATG-3' 5'-GAAGTCATCTCTGGGGCAAG-3' 5'-GAAGTCTAGATAAACGTGTCCG-3'	4E1-HP A For 4E1-HP A Rev 4E1-HP B For 4E1-HP B Rev	4E1-HP

- 6.12 **Loading buffer 6x**, 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.
- 6.13 **Agarosio**, prodotto commerciale definito adatto alla conduzione di elettroforesi per molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.14 **TAE soluzione 50x**, prodotto commerciale (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8,2–8,4 a 25°C). Conservare a temperatura ambiente fino a un massimo di 24 mesi.
- 6.15 **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.
- 6.16 **Bromuro di etidio soluzione**, prodotto commerciale 10 mg/L. Soluzione di lavoro: diluire 1:100000 (per 100 mL di gel di agarosio aggiungere 1 µL). Conservare secondo le specifiche del produttore.
- NOTA: Il bromuro di etidio è potenzialmente mutageno, carcinogeno e teratogenico, trattare con cautela tutte le soluzioni che contengono questa sostanza indossando guanti monouso.
- 6.17 **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 (5.5) secondo le specifiche del produttore.
- 6.18 **Acqua grado reagente o Milli-Q**, resistività $\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ o acqua DNAsi free fornita nel kit di PCR.
- 6.19 **Campione fecale di riferimento**, feci umane contenenti cisti di *G. duodenalis*, assemblaggio A, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA. Conservare in congelatore (5.2) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.20 **DNA di riferimento**: DNA genomici purificati da trofozoi in coltura di *G. duodenalis*, clone WB (assemblaggio A) e/o clone GS (assemblaggio B). Conservare in congelatore (5.2) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.21 **DNA di controllo dell'inibizione (DNA di *Trichinella spiralis*)**: DNA genomico (1ng/µL) purificato da larve di riferimento. Viene fornito dal Laboratorio di Referenza per la Trichinellosi (LRT) e prodotto presso il LRT da un pool di larve di riferimento secondo i protocolli presenti in Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989). Conservare in congelatore (5.2) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.22 **Set B**. Miscela di oligonucleotidi (6.11) utilizzata per la multiplex-PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume dei 10 oligonucleotidi (Tabella C). La concentrazione finale corrisponde a 10 pmoli/µL per ogni oligonucleotide. Aliquote di 100 µL vengono preparate e conservate in congelatore (5.2) fino a un massimo di 10 anni.


 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 6 di 13
--	---	--

Tabella C. Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il set B (6.22), relativi codici e sequenze nucleotidiche amplificate

Sequenza oligonucleotidi	codice	sequenza amplificata
5'-GTT.CCA.TGT.GAA.CAG.CAG.T-3'	cp1.F	ESV
5'-CGA.AAA.CAT.ACG.ACA.ACT.GC-3'	cp1.R	
5'-GCT.ACA.TCC.TTT.TGA.TCT.GTT-3'	cp2.F	ITS1
5'-AGA.CAC.AAT.ATC.AAC.CAC.AGT.ACA-3'	cp2.R	
5'-GCG.GAA.GGA.TCA.TTA.TCG.TGT.A-3'	cp3.F	ITS1
5'-TGG.ATT.ACA.AAG.AAA.ACC.ATC.ACT-3'	cp3.R	
5'-GTG.AGC.GTA.ATA.AAG.GTG.CAG-3'	cp4.F	ITS2
5'-TTC.ATC.ACA.CAT.CTT.CCA.CTA-3'	cp4.R	
5'-CAA.TTG.AAA.ACC.GCT.TAG.CGT.GTT.T-3'	cp5.F	ITS2
5'-TGA.TCT.GAG.GTC.GAC.ATT.TCC-3'	cp5.R	

- 6.23 **QIAxcel high resolution kit:** uno dei prodotti commerciali 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.
- 6.24 **Alignment marker:** uno dei prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore
- 6.25 **DNA size marker:** uno dei prodotti commerciali 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


7.2.1 Estrazione del DNA dal campione fecale da sottoporre al test

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

Ogni sessione di prova prevede che un campione fecale di riferimento (6.20) venga sottoposto alla procedura di estrazione ed identificato come 'controllo positivo di estrazione'.

Nota bene: il materiale fecale di riferimento, conservato in etanolo al 50%, prevede un lavaggio con acqua grado reagente (6.18) a 5000 rpm per 5 minuti per eliminare l'etanolo. Il pellet viene risospeso fino a 200 µL con acqua grado reagente (6.18) e si procede come indicato nel punto "b".

- a) ~~Trasferire 1 mL di ogni campione fecale contenente 50% etanolo in singole provette da 1,5 mL.~~
- b) ~~Centrifugare (5.1) le provette a 6000 x g per 5 minuti.~~
- e) ~~Eliminare il sopranatante ed aggiungere il volume di acqua necessario a ripristinare il volume di partenza.~~
- d) ~~Centrifugare come al punto 'b'.~~
- e) ~~Ripetere il lavaggio come al punto 'c'.~~
- a) Trasferire 200 µL di campione fecale in provette da 2 mL preventivamente marcate con l'opportuno

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 7 di 13
--	---	--

codice identificativo.

- b) Aggiungere 1 mL di InhibitEX buffer (6.1) e vortexare 1 minuto per omogeneizzare il campione.
- c) Incubare per 10 minuti a 95°C in termoblocco (5.3). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- d) Centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12000 x g
- e) Porre 25 µL di proteinasi K (6.2) 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 (6.3) e vortexare per 15 secondi.
- h) Incubare a 70°C per 10 minuti in termoblocco (5.3).
- i) Aggiungere 600 µL di etanolo assoluto (6.4) e vortexare (5.10) brevemente.
- j) Per ogni campione, posizionare una colonna di recupero (6.5) in un tubo di raccolta (6.6).
- k) Trasferire 600 µL di lisato (punto "i") nella colonna di recupero (6.5) e centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri.
- l) Eliminare il tubo di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in un nuovo tubo di raccolta (6.6).
- 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 (6.7) alla colonna di recupero (6.5) e centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri.
- o) Eliminare il tubo di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in un tubo di raccolta pulito (6.6).
- p) Aggiungere 500 µL di tampone di lavaggio AW2 (6.7) alla colonna di recupero (6.5) e centrifugare (5.1) per 3 minuti a 12.000 giri.
- q) Trasferire la colonna di recupero (6.5) all'interno di un nuovo tubo da 1,5 mL.
- r) Aggiungere 100 µL di tampone di eluizione ATE (6.8) alla colonna di recupero (6.5) ed incubare per 1-2 minuti.
- s) Centrifugare (5.1) per 1 minuto a 12.000 giri, eliminare la colonna di recupero (6.5), conservando il tubo contenenti il DNA estratto.
- t) Il DNA così preparato viene definito 'DNA/campione fecale' e conservato in congelatore (5.2). In tali condizioni può essere conservato fino a 5 anni.


7.2.2 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* (6.20) e di un controllo negativo, ovvero acqua (6.18), 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 (6.9), Set 11 (6.11) e controlli positivi di amplificazione (6.20).

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 8 di 13
--	---	--

- 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 di amplificazione).

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

2x PCR MasterMix (6.9)	25 µL
H ₂ O (6.18)	16 µL
Set11 (6.11)	4 µL
Totale	45 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex (5.3) e se necessario centrifugare (5.1) 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 (5.3) e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (Tabella E) del termociclatore (5.4), 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. 10 min a 90°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


- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.1) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.3 Visualizzazione dei risultati

L'analisi verrà condotta primariamente mediante elettroforesi capillare. Nel caso in cui il numero dei campioni da analizzare sia inferiore a 8, oppure lo strumento per l'elettroforesi capillare sia fuori servizio, si potrà procedere mediante elettroforesi su gel di agarosio.

7.2.3.1 *Elettroforesi capillare*

- a) Accendere lo strumento Qiaxcel (5.14) ed il relativo software di gestione (BioCalculator) sul PC collegato.

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 9 di 13
--	---	--

- b) Accedere al pannello “Instrument control” selezionando la voce dal menù “File”; il corretto funzionamento dell'applicazione viene evidenziato dall'assenza di segnalazioni di errore.
- c) Spostare il carrello delle provette in “posizione di accesso” selezionando la voce “Change Buffer” dal pannello “Instrument control”.
- d) Controllare che in posizione MARKER1 della vaschetta porta buffers siano presenti le 12 provette contenenti almeno 10 µL di “Alignment Marker” (6.24) prescelto e riportare il carrello delle provette in “posizione di corsa” selezionando la voce “Park” dal pannello “Instrument control”.
- 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 kit (6.23).
- f) Per ogni round di analisi (che può comprendere fino ad un massimo di 8 corse da 12 campioni) includere un provetta contenente il DNA size marker (6.25).
- g) In “Instrument control” impostare i parametri di corsa elettroforetica utilizzando i seguenti campi del pannello come segue:
 - “Method”= 0M500
 - “Sample”= nome operatore
 - “Pos”= riga di inizio corsa
 - “Time”= lasciare vuoto
 - “Runs”= numero di corse
 - “User ID”= MI-11
 - “Plate ID”= PCR+data
- h) Assicurarsi che le 12 caselle “Chan” che si riferiscono ai canali di corsa siano tutte selezionate.
- i) Assicurarsi che la casella “Automatically analyze after data acquisition” sia selezionata.
- j) Premere il tasto “Run” per iniziare la corsa elettroforetica.
- k) Al termine della corsa chiudere il programma e spegnere lo strumento.


Allineamento dei riferimenti di peso molecolare

Scorrere gli elettroferogrammi dei singoli campioni ed individuare, per confronto con l'elettroferogramma del controllo negativo, i picchi relativi ai 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 menù “Analysis” o utilizzando la relativa icona.

Sopra sono descritte le modalità standard per l'uso quotidiano, per tutte le altre necessità rimane inteso che il riferimento è il manuale d'uso dello strumento.

7.2.3.2 Visualizzazione dei risultati su gel di agarosio (alternativo a 7.2.3.1)

- a) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.6) seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- b) Pesare (5.11) 2 g di agarosio (6.13) e versarlo in 100 mL di TAE 1x (6.15) (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.

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 10 di 13
--	---	---

- 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 1 µL di soluzione di bromuro di etidio (6.16).
- h) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente il bromuro di etidio 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 (6.15).
- l) Miscelare 10 µL del prodotto di amplificazione (7.2.2 punto i) con 2 µL di loading buffer 6x (6.12) se non presente nella PCR Master Mix utilizzata.
- m) Caricare in ogni pozzetto 10 µL di ogni campione seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (7.2.2 punto b).
- n) Caricare il primo e l'ultimo pozzetto con 10 µL della soluzione L50 (6.17).
- o) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore (5.6) 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 (5.12) 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 (5.7) ed effettuare una stampa del risultato.

7.2.4 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) Il/i controllo/i positivo/i di amplificazione (6.20) 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).

7.2.4.1 Interpretazione dei risultati mediante elettroforesi capillare


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 (6.24);
- 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" (6.25) e con i

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 11 di 13
--	---	---

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 (6.25) e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

7.2.4.2 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR su gel agarosio

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 (6.17) e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione (6.19 e 6.20). La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

7.2.5 Verifica della presenza di inibitori tramite PCR con DNA di riferimento di *Trichinella spiralis*

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 *Trichinella spiralis* (6.21) verrà miscelato con il DNA/campione fecale (7.2.1 punto "t") ed 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 due controlli positivi, costituiti da DNA di riferimento (6.21), e di uno negativo, costituito da acqua (6.18), 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.

- a) Scongellare: DNA/campioni fecali, 2x PCR MasterMix (6.9), Set B (6.22), controllo positivo di amplificazione (6.21).
- 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 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 (6.9)	25 µL
H ₂ O (6.18)	9 µL
SetB (6.22)	1 µL
Totale	35 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex (5.3) e, se necessario, centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 35 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR.
- f) Aggiungere in ogni provetta 10 µL di DNA di controllo dell'inibizione (6.21) e 5 µL del DNA/campione fecale da analizzare (7.2.1 punto "t").

 Dipartimento MI	METODO DI PROVA IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette	MI-11 Rev. 1 Pag. 12 di 13
--	---	---

- g) Chiudere le provette, e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (Tabella G) del termociclatore (5.4), 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.

Tabella G – ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale	4 min/95°C
Amplificazione	10 s/95°C 30 s/55°C 30 s/72°C
Numero di cicli	35
Estensione finale	3 min/72°C

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.1) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- j) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.6 Visualizzazione dei risultati

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

7.2.7 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR su gel di agarosio

Qualora si osservi l'amplificazione del frammento specifico di *T. spiralis* di 173 paia di basi, la presenza di inibitori verrà esclusa ed il DNA/campione fecale verrà giudicato "negativo"; qualora non si osservi l'amplificazione del frammento specifico di *T. spiralis* di 173 paia di basi, il risultato sarà "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.

 <p>Dipartimento MI</p>	<p>METODO DI PROVA</p> <p>IDENTIFICAZIONE DEGLI ASSEMBLAGGI A e B di <i>Giardia duodenalis</i> MEDIANTE MULTIPLEX PCR</p> <p>Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette</p>	<p>MI-11</p> <p>Rev. 1</p> <p>Pag. 13 di 13</p>
--	---	--

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito www.iss.it/inet/spsl/index (*Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'ISS*).