

IDENTIFICAZIONE DI UOVA DI *Opisthorchis* spp MEDIANTE PCR

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	5
7.1	<i>Verifica del campione di prova</i>	5
7.2	<i>Esecuzione della prova</i>	5
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	11
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	11
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	
	111	



Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti

Dipartimento di Malattie Infettive
Reparto di Parassitosi Alimentari e Neglette
Istituto Superiore di Sanità



1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo di prova interno per determinare, mediante PCR, la presenza di uova di *Opisthorchis* spp. Il metodo può essere applicato a feci di origine umana od animale conservate in etanolo.

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 possiede una porzione di DNA caratteristica, per composizione e/o dimensione, è possibile scegliere una coppia di oligonucleotidi che permetta la sua amplificazione esclusivamente per quella specie. L'amplificazione PCR è caratterizzata da alta sensibilità e specificità.

I trematodi parassiti del genere *Opisthorchis* sono trasmessi all'uomo attraverso il consumo di pesci d'acqua dolce appartenenti principalmente alla famiglia Cyprinidae. Il genere *Opisthorchis* comprende le specie *O. felineus* ed *O. viverrini*, la prima diffusa in Europa, Federazione Russa e Siberia; la seconda specie invece diffusa nel Sud-est asiatico (Laos, Cambogia, Thailandia). I parassiti adulti si localizzano nelle vie biliari e causano stanchezza, perdita di peso, diarrea, ed episodi di ittero con o senza febbre. Nei casi avanzati si sviluppano ipertensione portale, infiammazione cronica e iperplasia dell'epitelio delle vie biliari, compresa la possibile invasione del dotto pancreatico. La cirrosi del fegato, o anche il colangiocarcinoma, possono sopraggiungere a complicare i quadri tardivi della malattia.

L'opisthorchiasi può essere diagnosticata mediante il riconoscimento della presenza delle uova del parassita nelle feci. La diagnosi può essere difficile a causa del ridotto numero di uova, le loro ridotte dimensioni e la loro peculiare morfologia che ad una analisi effettuata da personale non adeguatamente formato possono essere confuse con quelle di trematodi filogeneticamente affini o possono non essere riconosciute affatto.

I metodi molecolari basati sulla PCR permettono di determinare la presenza di uova del parassita in campioni fecali di origine umana ed animale anche quando il loro numero è troppo basso per poter essere rilevato all'esame microscopico.

Un marcatore molecolare utilizzato frequentemente per la diagnostica molecolare mediante PCR è l'Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2). L'ITS2 è uno spaziatore intergenico che separa i geni codificanti le subunità ribosomali 5.8S e 28S e, poiché non codifica alcun prodotto proteico o funzionale, è soggetto ad una maggiore variabilità genetica che lo rende un utile strumento diagnostico.

Utilizzando la tecnica di PCR applicata ad un frammento specifico dell'ITS2 è possibile distinguere, sulla base della dimensione dei prodotti di amplificazione, il genere *Opisthorchis* dal genere *Clonorchis*.

In tabella A sono visibili le dimensioni dell'ITS2 per 3 specie della famiglia Opisthorchidae prodotti mediante amplificazione con una coppia di oligonucleotidi specifici.

Tabella A - Dimensione dei prodotti di amplificazione della sequenza ITS2 attesi (in coppie di basi) per ogni specie

<i>O. felineus</i>	<i>O. viverrini</i>	<i>C. sinensis</i>
248	248	255

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Muller B., Schmidt J., Mehlhorn H. PCR diagnosis of infections with different species of Opisthorchidae using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers. *Parasitol Res* (2007) 100:905-909.

Qiagen: QIAamp Fast DNA Stool Handbook.

QIAxcel User manual.

4 DEFINIZIONI

ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2), spaziatore intergenico che separa i geni codificanti le subunità ribosomali 5.8S e 28S.

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

Set O, miscela di 2 oligonucleotidi che amplificano un frammento del gene ITS2 in specie della famiglia Opisthorchidae.

DNA di riferimento, DNA genomico purificato da adulti di *O. felineus*.

Controllo positivo di estrazione, aliquote di feci umane contenenti uova di *O. felineus*, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA.

Controllo positivo di amplificazione, DNA genomico purificato da adulti di *O. felineus*. E' utilizzato 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'efficienza 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 da banco per provette da 1,5-2,0 mL, min 20.000 x g
- 5.2 Congelatore, temperatura $\leq -15^{\circ}\text{C}$
- 5.3 Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C
- 5.4 Termociclatore per PCR
- 5.5 Frigorifero, 1°C - 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 (volume variabile 1-1000 μL)
- 5.9 Sistema di produzione di acqua di grado analitico (min 18M Ω/cm)
- 5.10 Agitatore Vortex
- 5.11 Bilancia risoluzione 0,1 g
- 5.12 Transilluminatore
- 5.13 Qiaxcel, sistema di elettroforesi verticale capillare

6 REATTIVI E MATERIALI

- 6.1 InhibitEX buffer.** Reagente reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN. Conservare a temperatura ambiente.
- 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 a temperatura ambiente.
- 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 a temperatura ambiente.
- 6.8 Tampone di eluizione.** Soluzione reperibile in commercio: QIAamp Fast DNA Stool, QIAGEN, e identificata dal produttore come Buffer AE. Conservare a temperatura ambiente.
- 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 grandi volumi il prodotto viene dispensato in aliquote da 1-2 mL, e vengono mantenute le specifiche di conservazione della confezione di origine.
- 6.10 SetO.** Miscela di oligonucleotidi (6.11) utilizzata per la PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume degli oligonucleotidi OpITS2f ed OpITS2r (6.11). La concentrazione finale corrisponde a 10 pmoli/ μ L di ciascun oligonucleotide. Aliquote di 100 μ L vengono preparate e conservate in congelatore (5.2) fino a un massimo di 10 anni.
- 6.11 Oligonucleotidi.** Preparazione commerciale (tabella B). Il prodotto liofilizzato viene ricostituito secondo le indicazioni del produttore ad una concentrazione di 100 pmoli/ μ L 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.

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

Sequenza oligonucleotidi	Codice	Regione genomica amplificata
5'-CGAGGGTCGGCTTATAAAC-3' 5'- AGCCTCAACCAAAGACAAAG-3'	OpITS2f OpITS2r	ITS2

- 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 6.6. 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 1.000 mL con acqua distillata. Preparare al momento dell'uso.

- 6.16 Bromuro di etidio soluzione**, prodotto commerciale 10 mg/L. Soluzione di lavoro: diluire 1:100.000 (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 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.
- 6.20 Alignment marker**: uno dei prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.21 DNA size marker**: uno dei prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.22 Campione fecale di riferimento**: feci umane contenenti uova di *O. felineus*. Viene fornito dal Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), laboratorio di riferimento tedesco per i parassiti con sede a Berlino, Germania. Conservare in congelatore (5.5) fino ad un massimo di **5 anni**.
- 6.23 DNA di riferimento *O. felineus***: DNA genomico estratto da adulti di *O. felineus*. Viene fornito dal Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), laboratorio di riferimento tedesco per i parassiti con sede a Berlino, Germania. Il DNA è prodotto presso il laboratorio stesso 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**.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Verifica del campione di prova

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 (6.23) venga sottoposto alla procedura di estrazione ed identificato come 'controllo positivo di estrazione'.

Nota bene: prima di iniziare la procedura di estrazione, lavare il materiale fecale con acqua grado reagente (6.18) e centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti per eliminare l'etanolo, quindi risospendere il pellet in un volume adeguato di acqua grado reagente.

- 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 (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 rpm
- e) Porre 25 µL di proteinasi K (6.2) in una provetta da 2 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 una provetta 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 rpm.
- l) Eliminare il tubo di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in una nuova provetta 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 rpm.
- o) Eliminare il tubo di raccolta (6.6) e posizionare la colonna di recupero (6.5) in una provetta di raccolta pulita (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 rpm.
- q) Trasferire la colonna di recupero (6.5) all'interno di una nuova provetta 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 rpm, eliminare la colonna di recupero (6.5), conservando la provetta contenenti il DNA estratto.
- t) Conservare a 4° C fino al momento dell'uso.

Il DNA così preparato viene definito 'DNA/campione fecale' e può essere conservato in congelatore (5.2) 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 positivo di amplificazione, ovvero DNA di riferimento di *O. felinus* (6.23) 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), SetO (6.10) e controllo positivo di amplificazione (6.23).

- 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 C) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 3 unità (controllo positivo di estrazione, controllo positivo di amplificazione e controllo negativo di amplificazione).

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

2x PCR MasterMix (6.9)	15 µL
H ₂ O	12 µL
SetO (6.10)	1 µL
Totale	28 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 28 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto 'b').
- f) Aggiungere in ogni provetta 2 µL di preparazione di DNA/campione fecale da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (tabella D) 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.

Tabella D. Ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale	5 min/94°C
Amplificazione	30 s/94°C 30 s/62°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.
- l) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.3 Visualizzazione dei risultati su gel di agarosio

- 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 (6.14) e versarlo in 100 mL di TAE 1x (6.16) preparato in un contenitore di vetro.
- c) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
- 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 con acqua il volume perso durante l'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 (6.17).
- 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 si solidifichi; non meno di 20 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 n) 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) Lasciare il gel sotto tensione 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 250 e 2.000 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 di acquisizione di immagini (5.7) ed effettuare una stampa del risultato.

7.2.4 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR su gel agarosio (alternativo a 7.2.5)

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 (6.23, 6.24). La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) il controllo positivo di amplificazione (6.23) mostra 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).

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 il DNA di riferimento di *O. felinus* (6.23) verrà miscelato in egual volume con il DNA/campione fecale (7.2.1 "t") ed amplificato secondo quanto descritto nel paragrafo 7.2.7, allo scopo di escludere la presenza di inibitori.

7.2.5 Visualizzazione dei risultati su elettroforesi capillare (alternativo a 7.2.4)

- a) Accendere lo strumento Qiaxcel (5.13) ed il relativo software di gestione Qiaxcel ScreenGel sul PC collegato.
- b) Accedere al pannello "Process Profile"; indicare alla voce "Cartridge Type" "DNA HighRes"; indicare il profilo e l'Experiment Directory desiderati.

- c) Spostare il carrello delle provette in “posizione di accesso” selezionando la voce “Load Position” dal pannello “Status Information”.
- d) Controllare che in posizione MARKER1 della vaschetta porta buffers siano presenti i 12 provette contenenti almeno 10 μ L dell’“Alignment Marker” (6.20) prescelto e riportare il carrello delle provette in “posizione di corsa” selezionando la voce “Park Position” dal pannello “Status Information”.
- e) Posizionare i campioni da analizzare (volume minimo 10 μ L) 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 μ L) in dotazione con il QIAxcel DNA High Resolution kit (6.19).
- 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 (6.21).
- g) In “Run Parameters” impostare alla voce “Method” l’opzione 0M500; 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 (6.20) 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) Al termine della corsa chiudere il programma e spegnere lo strumento.

Allineamento dei riferimenti di peso molecolare

Visualizzare le corse selezionando la modalità “Absolute migration time” dal menù “Image options” e processando i dati con il comando “Start analysis”. 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 “Start analysis” in modalità “Relative migration time” selezionando la relativa opzione. 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.

7.2.6 Interpretazione dei risultati dell’amplificazione PCR su 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 (6.20);
- 3) intensità del picco di emissione superiore ad un valore di threshold 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.

Le dimensioni dei prodotti di amplificazione vengono valutate nei seguenti modi:

- i) Mediante comparazione visiva delle bande con i pesi molecolari del “DNA size marker” (6.21) e con i controlli positivi di estrazione ed amplificazione sul gel virtuale;
- ii) Mediante confronto tra le dimensioni delle bande ottenute calcolate dal software dello strumento con la dimensione attesa.

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 il DNA di riferimento di *O. felinus* (6.24) verrà miscelato in egual volume con il DNA/campione fecale (7.2.1) ed amplificato secondo quanto descritto nel paragrafo 7.2.7, allo scopo di escludere la presenza di inibitori.

7.2.7 Verifica della presenza di inibitori tramite PCR con DNA di riferimento di *O. felinus*

Dove non espressamente indicato le provette sono mantenute in ghiaccio o in un 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 ovvero DNA di riferimento (6.23) e di uno 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.

- Scongellare: DNA/campioni fecali, 2x PCR MasterMix (6.10), SetO (6.10), controllo positivo di amplificazione (DNA di riferimento 6.23).
- Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 µL.
- 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 (1 per il controllo positivo, 1 per il controllo negativo di amplificazione).

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

2x PCR MasterMix (6.9)	15 µL
H ₂ O	10 µL
SetO (6.10)	1 µL
Totale	26 µL

- Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- Trasferire 26 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR
- Aggiungere in ogni provetta 2 µL di DNA di riferimento (6.23) e 2 µL del DNA/campione fecale da analizzare.
- Chiudere le provette, e centrifugare (5.1) al massimo dei giri per pochi secondi.
- 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 F – ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale	5 min/94°C
Amplificazione	30 s/94°C 30 s/62°C 30 s/72°C
Numero di cicli	35
Estensione finale	3 min/72°C

- 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.

7.2.8 Visualizzazione dei risultati

Per la visualizzazione dei risultati, seguire la procedura descritta ai punti 7.2.3 e 7.2.5

7.2.9 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR su gel di agarosio od elettroforesi capillare

Qualora si osservi l'amplificazione del frammento specifico di *O. felineus* di 248 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 *O. felineus* di 248 paia di basi, si procederà ad una nuova estrazione del DNA a partire dal campione di prova.

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

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

Se la banda di amplificazione è associabile a 248 bp, il campione viene considerato positivo per *Opisthorchis* spp.

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 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 <http://intranet.iss.it/prev/index.php?lang=1&anno=2020&tipo=13> (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).