

IDENTIFICAZIONE A LIVELLO DI SPECIE DI LARVE DI *Trichinella* 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	4
6	REATTIVI E MATERIALI	4
7	PROCEDIMENTO	6
	7.1 Preparazione del campione di prova	6
	7.2 Esecuzione della prova	6
	7.2.1 Estrazione del DNA dalla larva da sottoporre al test	6
	7.2.2 Amplificazione PCR	8
	7.2.3 Visualizzazione dei risultati	9
	7.2.4 Interpretazione dei risultati	10
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	11
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 la specie di appartenenza di singole larve di *Trichinella* conservate in etanolo mediante multiplex-PCR. Il metodo può essere applicato a larve prelevate da biopsia umana o da tessuti di origine animale.

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 che la distingue da altre specie filogeneticamente affini, è possibile scegliere una coppia di oligonucleotidi che permetta la sua amplificazione e quindi identifichi la sua presenza in campioni incogniti di materiale biologico. L'amplificazione PCR è caratterizzata da alta sensibilità e specificità.

Una variante della "PCR standard" è la multiplex-PCR nella quale vengono utilizzate 2 o più coppie di oligonucleotidi. In questo caso è possibile con un singolo test amplificare contemporaneamente più sequenze per identificare più specie con un singolo test.

Lo studio della biologia molecolare del genoma degli individui appartenenti al genere *Trichinella* ha permesso di riconoscere che quest'ultimo è composto da 8 specie, *T.spiralis*, *T.nativa*, *T.britovi*, *T.pseudospiralis*, *T.murrelli*, *T.nelsoni*, *T.papuae*, *T.zimbabwensis* e 3 varianti genotipiche definite come *Trichinella-T6*, *Trichinella-T8* e *Trichinella-T9*, morfologicamente indistinguibili. Le specie e le varianti di *Trichinella* differiscono tra loro per composizione e/o dimensione nella sequenza nucleotidica di diversi loci e l'analisi comparativa delle dimensioni di 3 sequenze nucleotidiche, ITS1, ITS2 e ESV, permette l'identificazione univoca di tutte le "trichinelle" epidemiologicamente rilevanti, *T.spiralis*, *T.nativa*, *T.britovi*, *T.pseudospiralis*, *T.murrelli*, *T.nelsoni*, *T.papuae*, *T.zimbabwensis* e *Trichinella-T6*.

In tabella A sono visibili le dimensioni dei frammenti di ITS1, ITS2 e ESV prodotti mediante amplificazione con coppie di oligonucleotidi specifici per le diverse "trichinelle". Dall'analisi della tabella A si evince che ogni "trichinella" possiede un repertorio di frammenti unico che permette la sua identificazione.

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

	<i>T.spiralis</i>	<i>T.nativa</i>	<i>T.britovi</i>	<i>T.pseudospiralis</i>	<i>T.murrelli</i>	<i>Trichinella-T6</i>	<i>T.nelsoni</i>	<i>T.papuae</i>	<i>T.zimbabwensis</i>
ESV	173	127	127*	280-350**	127	127	155	240	264*
ITS1			253			210			
ITS2					316		404***		

*La presenza di bande satelliti è frequentemente osservabile mediante elettroforesi capillare.

**Un bandeggio multiplo all'interno dell'intervallo di peso molecolare specificato è osservabile sia con elettroforesi capillare che con gel di agarosio.

***La banda a 404bp è di ausilio per il riconoscimento di *T. nelsoni*, ma non è indispensabile.

Lo sviluppo di un protocollo di multiplex-PCR che include 5 coppie di oligonucleotidi specifici permette di ottenere, da singole larve, con un solo esperimento di amplificazione, l'identificare della specie di appartenenza di un campione incognito. In tabella A sono riportate le dimensioni in paia di basi della banda/e attesa/e per ogni specie.

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Zarlenga DS, Chute MB, Martin A, Kapel CM. 1999. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. Int. J. Parasitol. 29(11):1859-67.

Pozio E, Foggini CM, Marucci G, La Rosa G, Sacchi L, Corona S, Rossi P, Mukaratirwa S. 2002. *Trichinella zimbabwensis* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. Int J Parasitol. 19;32(14):1787-99.

Pozio E, La Rosa G. 2003. PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. Methods Mol Biol. 216:299-309.

Pozio E, Zarlenga DS. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. Int J Parasitol. 2005 Oct;35(11-12):1191-204.

Pozio E, Rosa GL. Evaluation of the infectivity of *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* for equatorial freshwater fishes. Vet Parasitol. 2005 Sep 5;132(1-2):113-4.

Pozio E, Pagani P, Marucci G, Zarlenga DS, Hoberg EP, De Meneghi D, La Rosa G, Rossi L. *Trichinella britovi* etiological agent of sylvatic trichinellosis in the Republic of Guinea (West Africa) and a re-evaluation of geographical distribution for encapsulated species in Africa. Int J Parasitol. 2005 Aug;35(9):955-60.

Pozio E, Owen IL, Marucci G, La Rosa G. *Trichinella papuae* in saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) of Papua New Guinea. Emerg Infect Dis. 2004 Aug;10(8):1507-9.

Pozio E, Marucci G, Casulli A, Sacchi L, Mukaratirwa S, Foggini CM, La Rosa G. *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* induce infection in experimentally infected varans, caimans, pythons and turtles. Parasitology. 2004 Mar;128(Pt 3):333-42.

La Rosa G, Marucci G, Pozio E. Biochemical analysis of encapsulated and non-encapsulated species of *Trichinella* (Nematoda, Trichinellidae) from cold- and warm-blooded animals reveals a high genetic divergence in the genus. Parasitol Res. 2003 Dec;91(6):462-6. Epub 2003 Oct 14.

Pozio E, Marucci G. *Trichinella*-infected pork products: a dangerous gift. Trends Parasitol. 2003 Aug;19(8):338.

La Rosa G, Marucci G, Zarlenga DS, Casulli A, Zarnke RL, Pozio E. Molecular identification of natural hybrids between *Trichinella nativa* and *Trichinella T6* provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence. Int J Parasitol. 2003 Feb;33(2):209-16.

Pozio E, Casulli A, Bologov VV, Marucci G, La Rosa G. Hunting practices increase the prevalence of *Trichinella* infection in wolves from European Russia. J Parasitol. 2001 Dec;87(6):1498-501.

Pozio E, Pence DB, La Rosa G, Casulli A, Henke SE. *Trichinella* infection in wildlife of the southwestern United States. J Parasitol. 2001 Oct;87(5):1208-10.

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.

4 DEFINIZIONI

ITRC, International *Trichinella* Reference Center

ITS1 (Internal Transcribed Sequence 1), sequenza spaziatrice 1 dei geni ribosomali nucleari

ITS2 (Internal Transcribed Sequence 2), sequenza spaziatrice 2 dei geni ribosomali nucleari

ESV (Expansion Segment 5), sequenza appartenente al dominio 4 del gene ribosomale nucleare

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

SetB, miscela di oligonucleotidi che amplificano sequenze specifiche delle singole specie

Controllo positivo di estrazione, larva di riferimento trattata nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA

DNA/larva, preparazione di DNA estratto da una singola larva

Controllo positivo di amplificazione, DNA genomico estratto da larve di riferimento. È utilizzato nelle sessioni di amplificazione di singole larve per verificare l'efficienza del sistema multiplex-PCR

Controllo negativo di amplificazione, acqua distillata. È utilizzato nelle sessioni di amplificazione di singole larve per verificare l'assenza di contaminazioni nella reazione di PCR

Threshold, valore minimo di ampiezza che deve avere un picco di emissione per essere preso in considerazione dal software dello strumento

Nel testo del presente documento sono utilizzate inoltre le definizioni e la terminologia utilizzata nella norma UNI EN ISO 22174.

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

- 5.1 Stereomicroscopio, ingrandimenti 60-500 x
- 5.2 Centrifuga refrigerata da banco per provette da 1,5 mL, min. 10000 x g
- 5.3 Centrifuga per piastre da PCR
- 5.4 Congelatore, temperatura operativa $\leq -20^{\circ}\text{C}$
- 5.5 Frigorifero, temperatura operativa 4°C
- 5.6 Termoblocco vibrante per provette 1,5/2mL, temperatura variabile da 25 a 100°C
- 5.7 Termoblocco vibrante per provette 0,2mL, temperatura variabile da 25 a 70°C
- 5.8 Magnete con alloggiamento singolo o multiplo per provette da 1,5 mL
- 5.9 Termociclatore per PCR
- 5.10 Sistema per elettroforesi in agarosio completo di accessori e alimentatore di corrente
- 5.11 Qiaxcel, sistema di elettroforesi capillare
- 5.12 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g
- 5.13 Transilluminatore UV, può essere utilizzato anche quello integrato nel sistema di acquisizione di immagini (5.14)
- 5.14 Sistema per l'acquisizione di immagini
- 5.15 Micropipette (1-10 μL , 2-20 μL , 20-100 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL)
- 5.16 Agitatore Vortex
- 5.17 BioSprint 96, sistema di estrazione automatizzato del DNA

6 REATTIVI E MATERIALI

6.1 Tampone fosfato (PBS), pH $7,3 \pm 0,2$

KH_2PO_4	0,34 g
Na_2HPO_4	1,21 g
NaCl	8,0 g
Acqua distillata e deionizzata	fino 1000 mL

Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 750 mL di acqua distillata e deionizzata. Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione. Controllare il pH ($7,3 \pm 0,2$) e portare a volume. Conservare a temperatura ambiente. Stabilità: 6 mesi.

6.2 **DTT** - Ditiotreitolo, composto chimico reperibile in commercio. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.3 **PK** - Proteinasi k, enzima proteolitico ad ampio spettro, utilizzato per la digestione e rimozione della componente proteica in protocolli di purificazione degli acidi nucleici. Conservare

secondo le specifiche del produttore.

6.4 **DigiQ** - Soluzione di lisi preparata al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, 2 µL PK (6.3), 2 µL DTT 1M (6.2) e 16 µL PBS (6.1).

6.5 **LisiQ** - Soluzione di lisi preparata al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, 78 µL RLT (6.10) e 2 µL di resina paramagnetica (6.6).

6.6 **Qiagen MagAttract Suspension G** (codice 1026901). Sospensione contenente resina paramagnetica ad alta affinità per il DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.7 **AW1** - Tampone di lavaggio Qiagen codice 19081. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.8 **RPE** - Tampone di lavaggio Qiagen codice 1018013. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.9 **AE** - Tampone di eluizione Qiagen codice 19077. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.10 **RLT** - Tampone di lisi Qiagen codice 79216. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.11 **Rod cover** - Accessorio monouso che ricopre le punte del blocco magnetico per prevenire il contatto diretto del metallo con la soluzione

6.12 **PCR master mix hotstart** - Soluzione reperibile in commercio idonea all'esecuzione di esperimenti di amplificazione PCR. Può contenere o meno il loading buffer. Conservare secondo le specifiche del produttore. Nel caso si acquisti una confezione di grandi volumi il prodotto viene suddiviso in aliquote e vengono mantenute le specifiche di conservazione della confezione di origine.

6.13 **SetB** - Miscela di oligonucleotidi (6.14) utilizzata per la multiplex-PCR. La concentrazione finale corrisponde a 10 pmoli/µL. Aliquote vengono preparate e conservate in congelatore (5.4) fino a un massimo di 10 anni.

6.14 **Oligonucleotidi** - Preparazione commerciale (tabella B). Il prodotto liofilizzato viene ricostituito secondo le indicazioni del produttore ad una concentrazione di 100 pmoli/µL con TE 0,1x. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore (5.4) fino a un massimo di 20 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore (5.4) fino ad un massimo di 10 anni.

Tabella B - Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il setB (6.13), 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	

6.15 **Agarosio** - prodotto commerciale definito adatto alla conduzione di elettroforesi di molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.16 **TAE soluzione 50x** - prodotto commerciale, (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8.2–8.4 a 25°C). Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.17 **TAE soluzione 1x** - preparazione di 1000 mL: prelevare 20 mL della soluzione 50x e portare a 1000 mL con acqua distillata. Preparare al momento dell'uso.

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

- 6.19 **L50** - 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 (5.6) secondo le specifiche del produttore.
- 6.20 **TE soluzione 1x** - prodotto commerciale 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA-Na₂, pH 7.6–8.1 a 25°C. Conservare in frigorifero (5.5) secondo le specifiche del produttore.
- 6.21 **TE soluzione 0.1x** - soluzione TE 1x diluita. Preparazione di 10 mL: prelevare 1 mL della soluzione 1x e aggiungere 9 mL di acqua distillata. Sterilizzare usando filtri 0.22 µm. Preparare al momento dell'uso.
- 6.22 **Acqua DNAsi free** - per uso in biologia molecolare, reperibile in commercio o nei kit commerciali.
- 6.23 **Larve di riferimento** - singole larve muscolari di *Trichinella* sp. conservate in etanolo (95-100%). Sono fornite dal ITCR in seguito ad isolamento da tessuto muscolare di topo mediante digestione artificiale cloruro/peptica (per la procedura parte operativa vedi la procedura "Experimental infection of mice by *Trichinella* spp. muscle stage larvae", consultabile all'indirizzo <https://www.iss.it/en/-/standard-operating-procedures-sops->). Conservare in congelatore (5.4) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.24 **DNA di riferimento** - DNA genomico (1ng/µL) purificato da larve riferimento. Conservare in congelatore (5.4) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.25 **QIAXcel DNA High Resolution kit** - prodotto commerciale della Qiagen per l'uso con il Qiaxcel (5.11). 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.
- 6.26 **Alignment markers** - da utilizzare con 5.11, prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore
- 6.27 **DNA size markers** - da utilizzare con 5.11, uno dei prodotti commerciali della Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.28 **Loading buffer** - prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA. Conservare secondo le specifiche del produttore.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione di prova

Le larve pervenute per l'identificazione saranno controllate per la verifica del loro stato di conservazione ed integrità.

L'etanolo contenente le larve da analizzare verrà travasato in una piastra petri. Il contenuto verrà ispezionato utilizzando uno stereomicroscopio (5.1) e 5 larve, verranno prelevate e trasferite separatamente in 5 provette da 1,5 mL o in 5 pozzetti di una piastra da PCR. Qualora le larve siano in numero inferiore a 5 si opererà su tutte le larve disponibili. L'etanolo in eccesso verrà eliminato o lasciato evaporare. Utilizzando lo stereomicroscopio (5.1) si controllerà che ogni provetta/pozzetto contenga una sola larva.

Centrifugare (5.2 o 5.3) le provette/piastra contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.

Conservare i campioni così preparati in congelatore (5.4) In tali condizioni le larve possono essere conservate per l'estrazione fino a 5 anni.

Qualora l'operatore non reputi le larve del campione di prova idonee all'esecuzione del test, o non trovi larve all'interno del contenitore, il test non viene eseguito.

7.2 Esecuzione della prova

7.2.1 Estrazione del DNA dalla larva da sottoporre al test

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

Ogni sessione di prova, in tubo o in piastra, prevede che una larva di riferimento venga sottoposta alla procedura di estrazione ed identificata come "controllo positivo di estrazione".

Preparare in anticipo nelle quantità necessarie le soluzioni DigiQ (6.4) e LisiQ (6.5)

L'estrazione del DNA può essere eseguita sia in provette da 1,5 mL che in piastre PCR da 96 pozzetti. La scelta viene lasciata all'operatore

7.2.1.1 Estrazione del DNA in provette da 1,5 mL

- a) Centrifugare (5.2) le provette contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.
- b) Aggiungere 20 μ L di DigiQ (6.4).
- c) Incubare a 42°C per 15-30 minuti in termoblocco (5.6). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- d) Centrifugare come al punto "a".
- e) Aggiungere 80 μ L di soluzione LisiQ (6.5).
- f) Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente in termoblocco (5.6). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- g) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.8) e attendere 30-60 secondi che le particelle di resina paramagnetica siano bloccate dal campo magnetico sulla parete della provetta.
- h) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione facendo attenzione a non toccare le particelle di resina.
- i) Aggiungere 100 μ L di AW1 (6.7) e risospendere le particelle di resina mediante vortex.
- j) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.8) come al punto "g".
- k) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- l) Aggiungere 100 μ L di RPE (6.8) e risospendere le particelle resina mediante vortex.
- m) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.5) come al punto "g".
- n) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- o) Ripetere la fase di lavaggio (punti da "l" a "n") con RPE (6.8).
- p) Dopo l'ultimo lavaggio lasciare le provette aperte per asciugare le particelle di resina per 15-20 minuti.
- q) Aggiungere 60 μ L di tampone di AE (6.9) e risospendere delicatamente le particelle di resina, non usare il vortex.
- r) Incubare per 5 minuti (temperatura permessa tra 25-65°C). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- s) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.8) come al punto "g".
- t) Recuperare la fase liquida (DNA/larva) e trasferirla in nuove provette da 1,5 mL.
- u) Conservare a 4° fino al momento dell'uso

7.2.1.2 Estrazione del DNA in piastre da 96 pozzetti

- a) Aggiungere in ogni pozzetto contenente le larve da analizzare 20 μ L di soluzione di DigQ (6.4). Marcare la piastra "DNA/lisi".
- b) Incubare a caldo (40-42°C) per 15-30 minuti in termoblocco (5.7). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 800 oscillazioni al minuto, coprire la piastra con una pellicola protettiva.
- c) Aggiungere in ogni pozzetto 80 μ L di soluzione LisiQ (6.5).
- d) Preparare una piastra marcata "W1" aggiungendo 100 μ L di AW1 (6.7) nei corrispondenti pozzetti della piastra "DNA/lisi" che contengono i campioni da analizzare.
- e) Preparare 2 piastre marcate "W2" e "W3" aggiungendo 100 μ L di RPE (6.8) nei corrispondenti pozzetti della piastra "DNA/lisi" che contengono i campioni da analizzare.
- f) Preparare una piastra marcata "eluizione" aggiungendo 60 μ L di tampone AE (6.9) nei corrispondenti pozzetti della piastra "DNA/lisi" che contengono i campioni da analizzare.

- g) Accendere il BioSprint (5.17) e avviare il protocollo di estrazione selezionando mediante le frecce del tastierino frontale il protocollo “MI-02 qiagen”.
- h) Collocare le piastre preparate negli alloggiamenti seguendo le istruzioni che appaiono sul display verificando che tutte abbiano lo stesso orientamento.
- i) Avviare il programma con il comando “start”.
- j) Al termine del programma di estrazione recuperare la piastra “eluizione” che contiene il DNA/larva da analizzare. Nei pozzetti potrebbe essere visibile della resina residua ma questo non inficia il risultato finale.
- k) Conservare a 4° C fino al momento dell’uso.

Le soluzioni di “DNA/larva” possono essere conservate in congelatore (5.4) fino a 10 anni.

7.2.2 Amplificazione PCR

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

In ogni sessione di prova è previsto l’utilizzo di un controllo positivo, ovvero DNA di riferimento (6.24) e di uno negativo, ovvero acqua (6.22), per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l’utilizzo di una PCR Master Mix (6.12) a concentrazione 2x, in caso di concentrazione diversa modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongelare: DNA/larva preparati in precedenza da sottoporre ad analisi, PCR Master Mix (6.12), controllo positivo di amplificazione (6.24).
- b) Marcare con un numero progressivo le provette da PCR da 0,2 mL da utilizzare nella prova ovvero marcare una piastra da PCR con la data del giorno.
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della tabella C e del numero totale dei campioni da analizzare includendo i controlli di PCR e un campione “virtuale” ogni 10 reali.

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

2x PCR MasterMix (6.12)	15 µL
H ₂ O	4 µL
SetB (6.13)	1 µL
Totale	20 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e se necessario centrifugare (5.2/5.3) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 20 µL della miscela di amplificazione in provette/piastra preparate al punto “b”.
- f) Aggiungere in ogni provetta/pozzetto 10 µL di preparazione di DNA/larva da analizzare.
- g) Chiudere le provette, e centrifugare (5.2 o 5.3) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Trasferire le provette/piastra nel termociclatore (5.9) e avviare il programma di amplificazione Mi-02 (tabella D).

Tabella D – ciclo di amplificazione MI-02

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

#La durata della denaturazione iniziale può variare a seconda delle specifiche del produttore della PCR Master Mix.

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.2-5.3) le provette/piastra al massimo dei giri per pochi secondi.
- j) Lasciare le provette/piastra in ghiaccio o in frigorifero (5.5) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.3 Visualizzazione dei risultati

La visualizzazione dei risultati ottenuti con i due metodi di estrazione può essere eseguita sia mediante elettroforesi su gel di agarosio che mediante elettroforesi capillare.

7.2.3.1 Elettroforesi

- a) Accendere lo strumento Qiaxcel (5.11) 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 10 μ L (volume minimo) dell'"Alignment Marker" (6.26) 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 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 (6.25).
- 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 (6.27).
- 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 (6.26) prescelto.
- i) In "Sample Information" 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 (6.25) 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.

Se lo strumento Qiaxcel (5.11) è fuori servizio per un periodo prolungato procedere con gel di agarosio seguendo il protocollo di seguito riportato:

- a) Aggiungere in ogni campione da analizzare il loading buffer (6.28), secondo le specifiche del produttore, se non presente nella PCR master mix.
- b) Mescolare i campioni mediante vortex e centrifugare (5.2 o 5.3) le provette/piastra al massimo dei giri per pochi secondi.
- c) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.10) seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- d) Pesare (5.12) 2 grammi di agarosio (6.15) e versarli in 100 mL di TAE 1x (6.17) preparati in un contenitore di vetro.
- e) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
- f) 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.

- g) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
- h) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- i) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere l'intercalante del DNA (6.18) secondo le specifiche del produttore.
- j) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente l'intercalante del DNA e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato (punto "a") in precedenza.
- k) Aspettare che il gel si solidifichi; non meno di 30 minuti.
- l) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- m) Coprire il gel con tampone TAE 1x (6.17).
- n) Caricare in ogni pozzetto 20 μ L del prodotto di amplificazione seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette stabilito al punto 7.2.2 "b".
- o) Il primo e l'ultimo pozzetto sono caricati con 15 μ L della soluzione L50 (6.19).
- p) Connettere l'apparato per elettroforesi (5.10) all'alimentatore e impostare un valore di tensione di 10 v/cm di gel.
- q) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer (6.28) non raggiunge 1 cm dal bordo del gel.
- r) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV (5.13) la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di pesi molecolari comprese tra 50 e 500 bp. Se la separazione è insufficiente lasciare il gel sotto tensione fino ad avere una separazione adeguata.
- s) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.14) ed effettuare una stampa del risultato.

Allineamento dei riferimenti di peso molecolare

Visualizzare le corse selezionando la modalità "Absolute migration time" dal menù "Image options" e processare 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 al 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" selezionando l'opzione "Relative migration time".

Stampare i risultati ottenuti per l'archiviazione.

Sopra sono descritte le modalità standard per l'uso quotidiano, per tutte le altre necessità fare riferimento al manuale d'uso dello strumento.

7.2.4 Interpretazione dei risultati

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) il controllo positivo di amplificazione 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);
- iii) il controllo positivo di estrazione produce un prodotto di amplificazione in accordo con la tabella A;

7.2.4.1 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 (6.26);
- 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.

Nel caso delle specie *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* e *T. zimbabwensis* viene accettata la presenza di bande satelliti a carico del marcatore ESV.

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” (6.27) 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 mostri una banda non attesa, l'identificazione a livello di specie non sarà possibile, il risultato della prova verrà espresso come “specie non determinabile”.

7.2.4.2 Elettroforesi su gel di agarosio

Le dimensioni delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi su gel di agarosio vengono valutate per comparazione visiva delle stesse con i pesi molecolari di riferimento L50 (6.19) e con i controlli positivi di estrazione ed amplificazione. Considerato che le differenze tra le specie sono macroscopiche (vedi tabella A) la valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

L'identificazione della specie viene effettuata confrontando le dimensioni delle bande prodotte dal campione di prova con la tabella A.

Qualora un campione mostri una banda non attesa, l'identificazione a livello di specie non sarà possibile, il risultato della prova verrà espresso come “specie 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 173 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. spiralis*.

Se la banda di amplificazione è associabile a 127 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. nativa*.

Se le bande di amplificazione sono associabili a 127 bp e a 253 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. britovi*. Viene considerata valida ai fini del riconoscimento della specie anche la presenza della sola banda specifica 253 bp.

Se le bande di amplificazione sono comprese nell'intervallo di peso molecolare 280-350 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. pseudospiralis*.

Se le bande di amplificazione sono associabili a 127 bp e a 316 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. murrelli*. Viene considerata valida ai fini del riconoscimento della specie anche la presenza della sola banda specifica 316 bp.

Se le bande di amplificazione sono associabili a 127 bp e a 210 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *Trichinella* T6. Viene considerata valida ai fini del riconoscimento della specie anche la presenza della sola banda specifica 210 bp.

Se la banda di amplificazione è associabile a 155 bp, con o senza la copresenza della banda specifica a 404 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. nelsoni*.

Se la banda di amplificazione è associabile a 240 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. papuae*.

Se la banda di amplificazione è associabile a 264 bp, la larva è identificata come appartenente alla specie *T. zimbabwensis*.

Qualora il test risulti valido e il campione analizzato mostri una banda di amplificazione non classificabile tra quelle presenti in tabella A, l'identificazione della specie non sarà possibile, il risultato della prova verrà espresso come “specie non determinabile”.

Quando possibile vengono analizzate 5 larve separatamente per ogni campione di prova. L'identificazione dell'isolato analizzato viene ritenuta valida se almeno una larva mostra un pattern di amplificazione atteso (tabella A).

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di ripetibilità e specificità. I risultati della procedura di validazione 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 dei campioni e reagenti 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://fintranet.iss.it/web/guest/spp-sistema-di-gestione-della-salute-e-sicurezza>.