

PROGETTO DI RICERCA CORRENTE 2016007

LA DIGITAL PRC A SUPPORTO DEL METODO ISO/TS 15216-2:2013 NELLA QUANTIFICAZIONE DEI VIRUS A TRASMISSIONE ALIMENTARE

Al progetto hanno partecipato le seguenti Unità Operative:

U.O. N° 1: Unità operativa Coordinatrice – Reparto Controllo Alimenti IZSLER - Dr.ssa Barbara Bertasi (Responsabile Scientifico)

U.O. N° 2: Reparto Tecnologie Biologiche Applicate IZSLER – Responsabile U.O. Dott.ssa M.B. Boniotti

U.O. N° 3: Istituto Superiore di Sanità – Responsabile U.O. dott.ssa Suffredini Elisabetta

U.O. N° 4: Laboratorio di Biotecnologia applicata agli Alimenti IZSLT – Responsabile U.O. Sarah Lovari

Obiettivi del progetto

- 1) acquisizione di informazioni sul comportamento dei sistemi digital rispetto ai materiali di riferimento; messa a punto della metodica
- 2) acquisizione di informazioni relative alla quantificazione in dPCR dei target virali in matrice
- 3) valutazione e confronto della metodica digital con la metodica di riferimento ISO 15216.

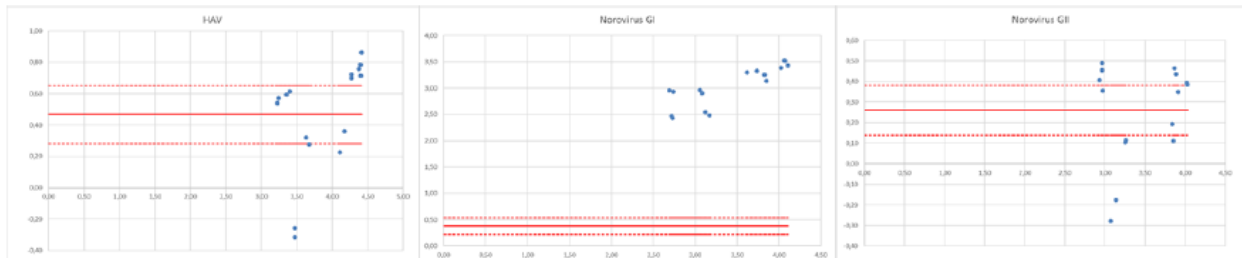
Il metodo di quantificazione di HAV e NoVs, basato sull'applicazione della one step real-time RT-PCR viene descritto dettagliatamente nella ISO/TS15216-1:2013; le matrici alimentari comprese nel campo di applicazione sono rappresentate da frutti di bosco, vegetali, acqua e molluschi. Per quanto riguarda la fase di messa a punto della digital PCR le fasi di estrazione e preparazione del campione sono state effettuate come descritto per la one step real time RT-PCR. Per le reazioni di digital PCR sono stati utilizzati due tipi di strumenti digital: QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad) e Applied Biosystems® QuantStudio 3D digital PCR system (QS3D). Le reazioni sono state effettuate utilizzando gli stessi primer, sonde e concentrazioni descritti per la one step real-time RT-PCR. Al termine della messa a punto, per tutte le fasi successive del progetto, è stato selezionato un protocollo digital PCR da applicare sullo strumento Life Technologies basato sull'utilizzo della mastermix Bio-Rrad (One Step RT-ddPCR Advanced Kit for probe).

Le fasi successive hanno comportato prove di confronto del protocollo applicate su differenti matrici, prove di confronto fra metodica normata e sistema digital PCR e validazione del sistema digital. Il calcolo dei differenti parametri è stato condotto mediante indicazioni delle ISO 16140-2:2016 e 5725-2:1994.

Differenze significative sono state riscontrate nella determinazione dei tre virus nelle matrici in esame, in particolare a basse concentrazioni; viene di seguito riportata una tabella in cui vengono indicate le significatività dei confronti:

	HAV		GI		GII	
	10 ² cg/μL	10 ³ cg/μL	10 ² cg/μL	10 ³ cg/μL	10 ² cg/μL	10 ³ cg/μL
ANOVA	-	p = 0.415	-		-	p = 0,231
Kruskal Wallis	p = 0.0305	-	p = 0.0101	p = 0.006	p = 0.005	-

Le valutazioni della rispondenza delle quantificazioni digital rispetto ai valori noti in matrice (ottenuti in one step real-time RT-PCR) hanno prodotto dati discordanti. Per quanto riguarda il confronto fra la metodica ufficiale e la digital PCR applicata in matrice, la tecnica di Bland Altman ha confermato una differenza significativa nella quantificazione ottenuta con le due metodiche per tutti e tre i virus; secondo i criteri riportati in ISO i due sistemi non risultano paragonabili. Sono di seguito riportati i grafici relativi ai confronti.



One step real-time RT-PCR e digital PCR non sono risultate paragonabili neppure a seguito della validazione eseguita, secondo i criteri ISO 16140, su sospensioni virali di HAV. La validazione eseguita sul metodo digital priva di confronto con il gold standard ha permesso di calcolare parametri di ripetibilità e riproducibilità ed incertezza che sembrano diminuire al diminuire della concentrazione.

La metodica digital non presenta, almeno per quanto riguarda la detection dei virus in esame, dei parametri particolarmente migliorativi rispetto al metodo normato; l'incertezza di misura della precisione, almeno sulle concentrazioni inferiori, ha permesso di ottenere dei risultati promettenti. In ogni caso la metodica digital PCR, a seguito delle prove eseguite nel presente studio, attualmente non risulta essere un metodo confrontabile con la metodica normata.