



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche

Master di II Livello in DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA AVANZATA

**PROGETTAZIONE E SVILUPPO DI UN
KIT PER LA RILEVAZIONE DI HAV E NoV
IN MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE
REAL-TIME RT-PCR**

Relatore: Prof.re Fausto Baldanti

Studente: Cristina Pilotti
Matricola: 452728

Anno Accademico 2016/2017

Background

- Il consumo giornaliero di cibo rende ogni persona a rischio di contrarre una patologia veicolata dagli alimenti.
- L'elevata morbidity associata alle infezioni alimentari ha un notevole impatto dal punto di vista non soltanto della salute pubblica ma anche economico.
- HAV e NoV sono gli agenti virali maggiormente coinvolti nelle malattie trasmesse dagli alimenti.
- La metodologia d'elezione per la rilevazione di questi virus è la RT-PCR, ma non esistono molti kit disponibili per la rilevazione di HAV e NoV in matrici alimentari.

Obiettivo

- Sviluppare, in accordo con la norma ISO/TS 15216-2:2013, un metodo qualitativo per la rilevazione del genoma di HAV e NoV GI e GII in matrici alimentari mediante l'utilizzo di un protocollo di One step TaqMan real-time RT-PCR.
- Kit in formato liofilizzato:
 - ✓ minimizzazione dell'errore umano;
 - ✓ risparmio in termini di tempo;
 - ✓ trasporto e conservazione a temperatura ambiente.

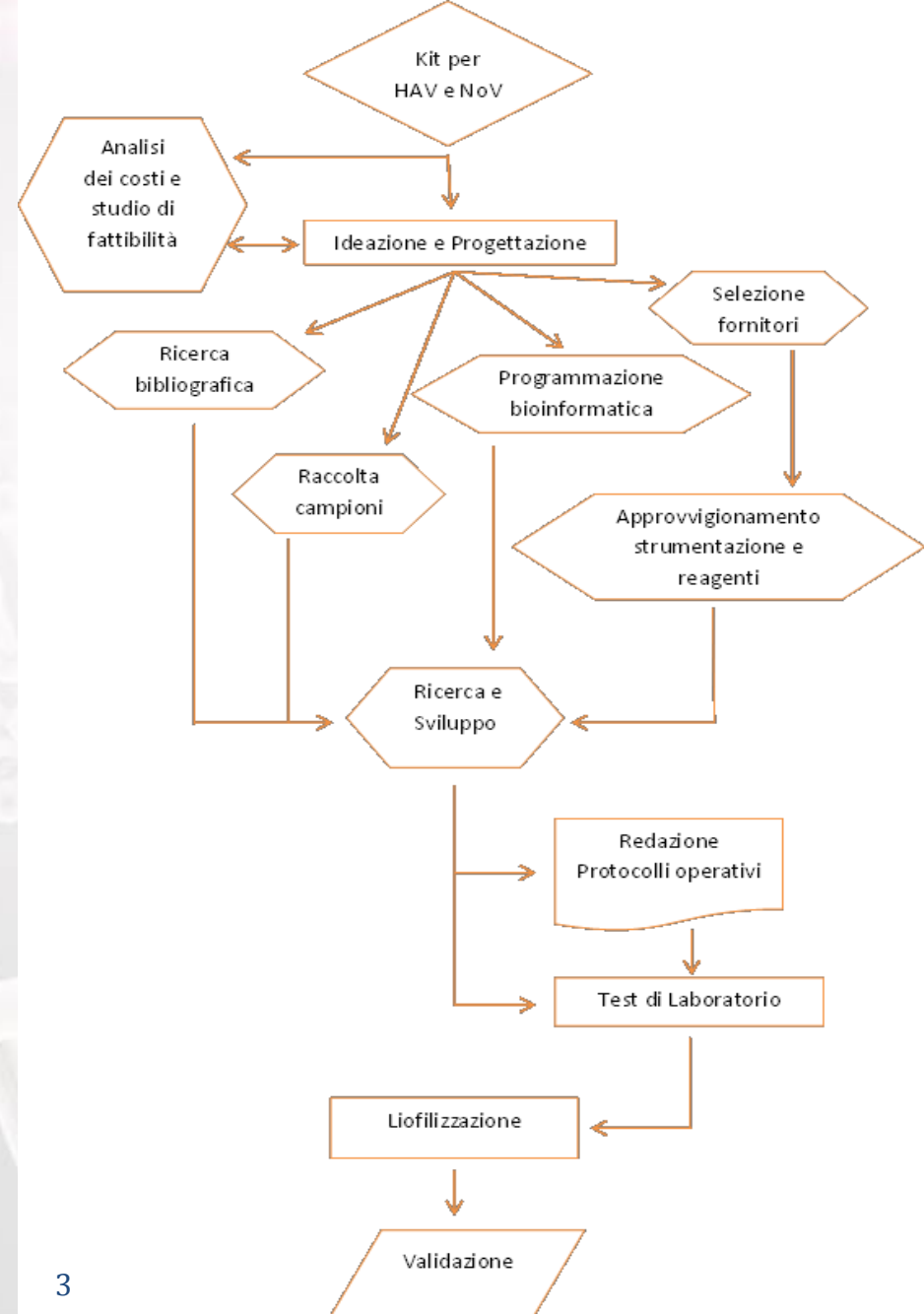
Schema operativo

Studio di fattibilità e analisi dei costi:

- valutazioni tecniche;
- valutazioni economiche.

Selezione dei fornitori:

- approvvigionamento reagenti e strumentazione.



Schema operativo

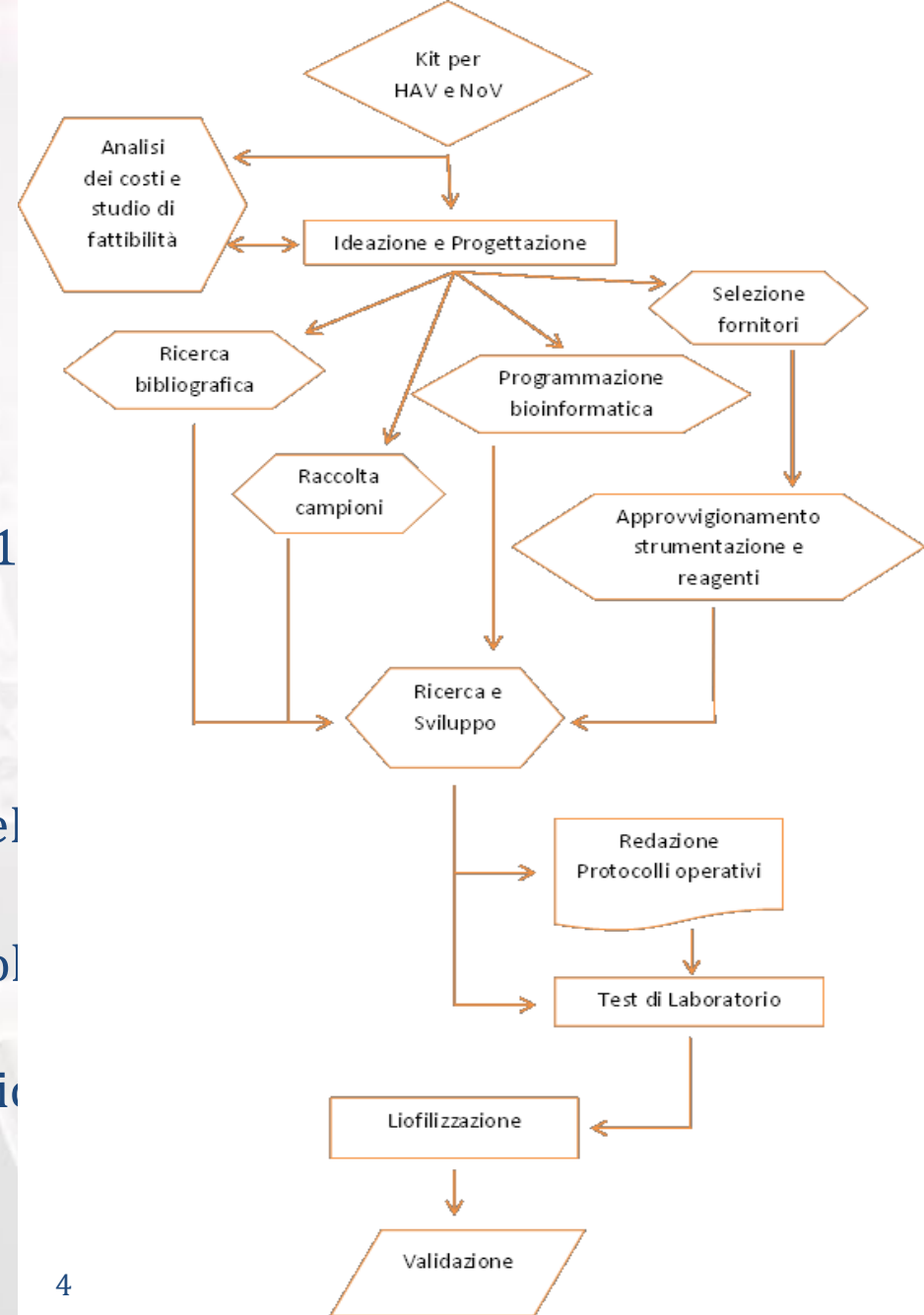
Ricerca bibliografica:

- HAV e NoV → ISO/TS 15216-2:201

Mengo virus

colture cellulari (HeLa)

- liofilizzazione → biologia molecolare
 - ✓ reagenti di PCR pre-dosati e liofilizzati nei supporti di reazione
 - ✓ costi elevati.



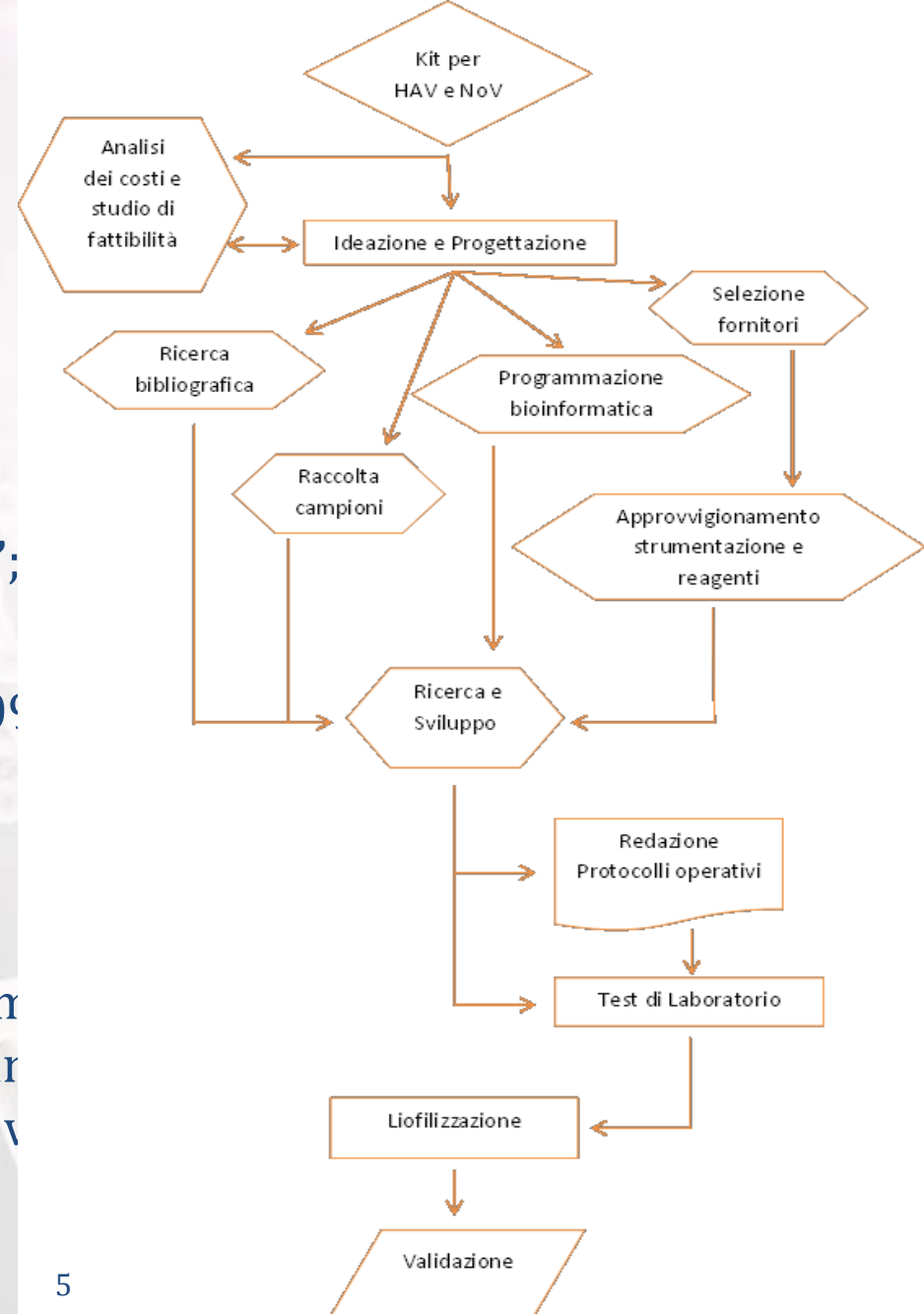
Schema operativo

Analisi bioinformatica:

- HAV: regione non codificante al 5';
- NoV: estremità 5' di ORF2;
- Mengo virus: nucleotidi 110-209 ceppo MC0.

Raccolta dei campioni:

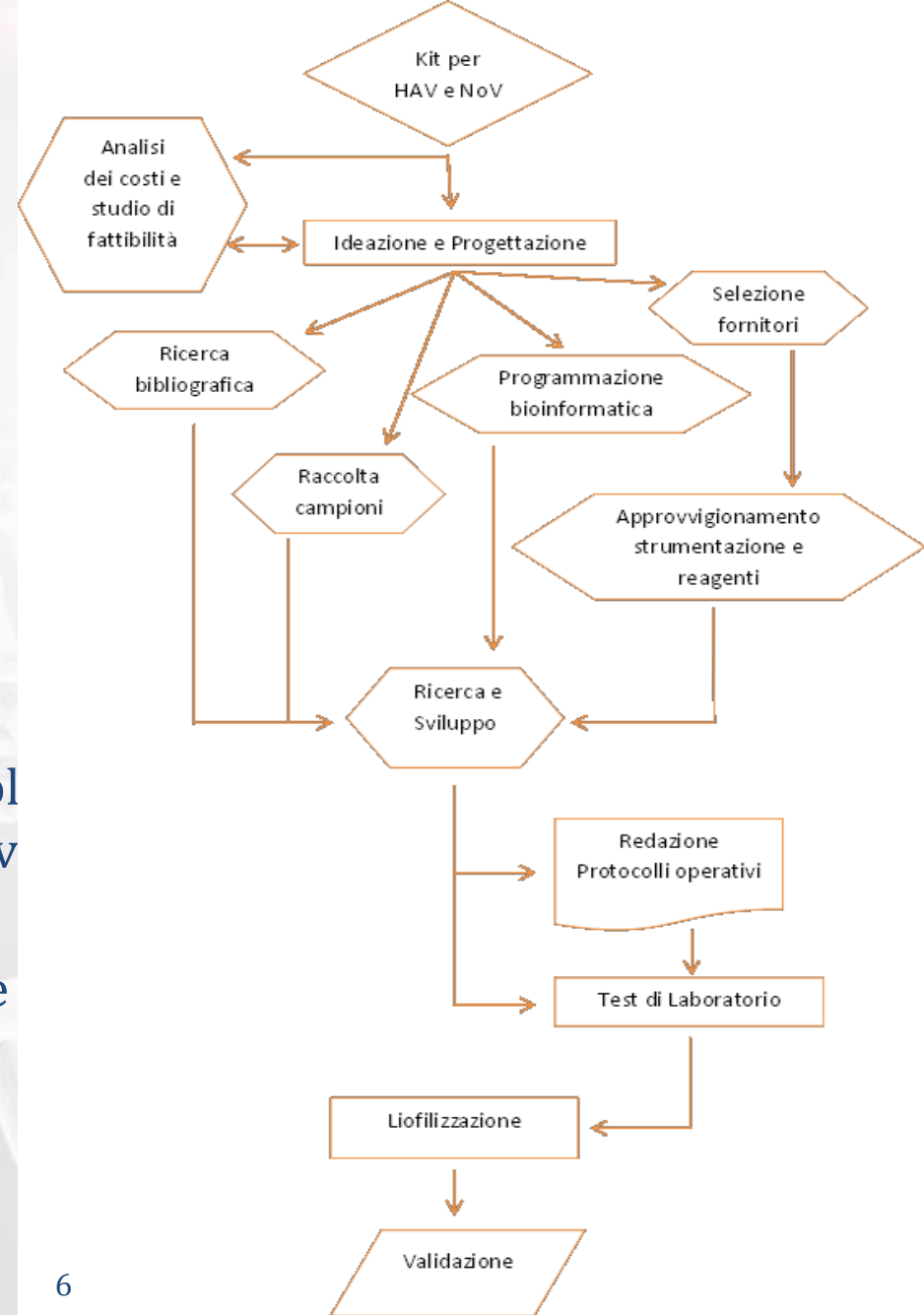
- HAV e NoV: Materiali di Riferimento Certificati e campioni da alimenti naturalmente contaminati da tali virus
- Mengo virus: MC0 ed HeLa.



Schema operativo

R&D:

- protocolli operativi:
 - ✓ HeLa;
 - ✓ Mengo virus;
 - ✓ Materiali di Controllo (Control Processo, Controlli positivi Controllo di Inibizione).
- messa a punto del kit mediante step real-time RT-PCR.



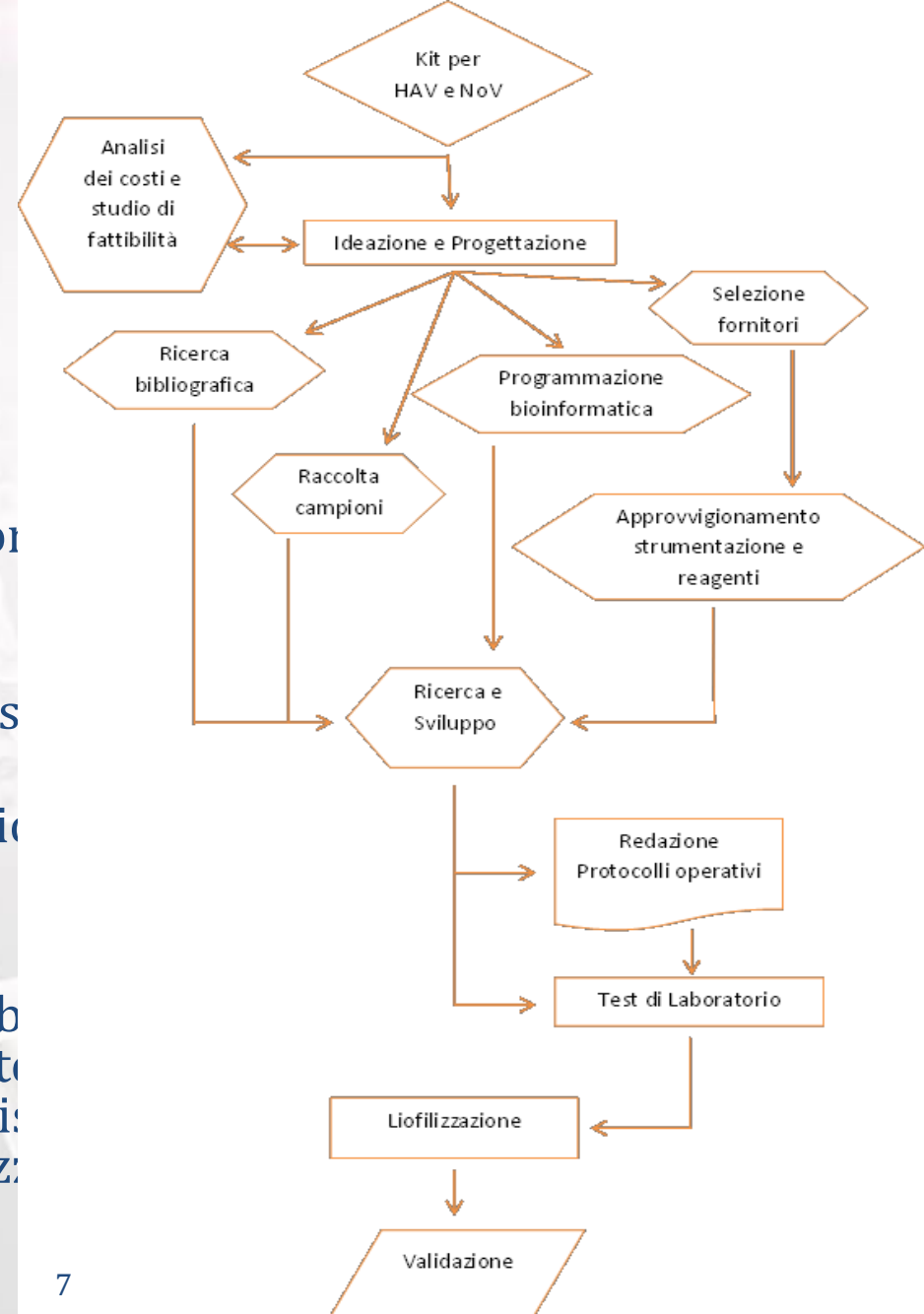
Schema operativo

Liofilizzazione:

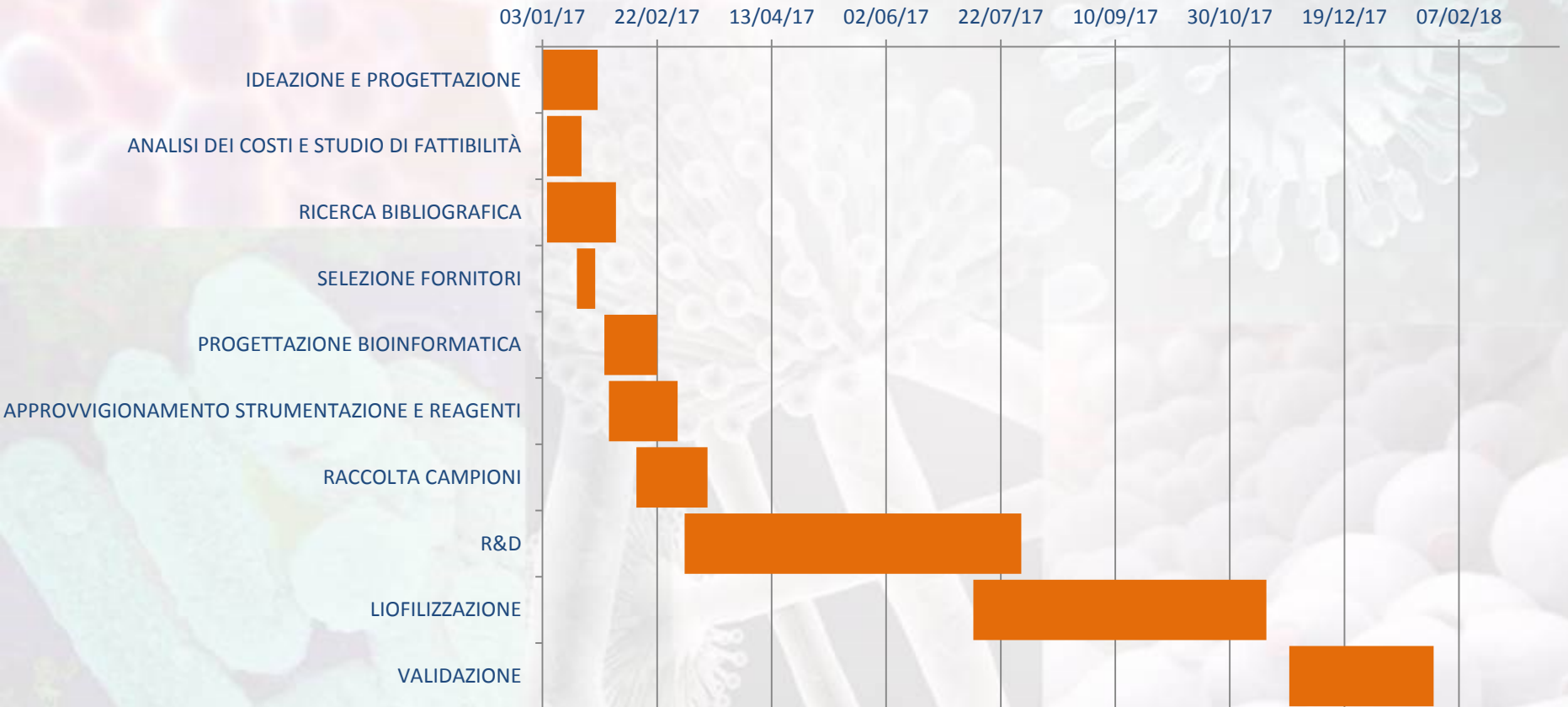
- mix di PCR pre-dosata nei supporti reazione;
- agente crioprotettivo;
- reagenti compatibili col process liofilizzazione;
- volume liofilizzazione: 15µl/reazione

Validazione:

- linee guida MIQE: sensibilità, specificità, efficienza, accuratezza, precisione, linearità di misurazione, ripetibilità, incertezza, robustezza, LOD.



Schema operativo



Soluzioni proposte

- Multiplex HAV + NoV I + NoV II + IAC (Controllo interno di amplificazione)



perdita del LOD



2 Multiplex:

✓ HAV + IAC;

✓ NoV I + NoV II + IAC.

} mantenimento
del LOD

- Kit *ad hoc* per il Mengo virus.

Prospettive future

- Implementazione della quantificazione dei virus target secondo la norma ISO 15216-1:2017.
- Rilevazione di altri virus target:
 - ✓ HEV;
 - ✓ NoV IV.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il personale dell'Unità Operativa di Microbiologia e Virologia della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia per la professionalità, la disponibilità e la gentilezza con le quali mi hanno seguito durante il periodo di tirocinio.

Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Michela Savoldi Boles che, in qualità di responsabile scientifico di Bioside, azienda in cui lavoro, mi ha dato la possibilità di scrivere la tesi di Master sul progetto HAV-NoV.