

PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE
CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE

Progetto presentato da: Vodret Bruna

Area tematica: Macro Obiettivo 10 Rafforzare le attività di prevenzione in sicurezza alimentare e sanità pubblica veterinaria per alcuni aspetti di attuazione del Piano Nazionale Integrato dei Controlli Programmi regionali: P - 10.1 Integrazione dei controlli sulla sicurezza alimentare; P - 10.3 Gestione delle emergenze epidemiche e non epidemiche P - 10.4 Prevenzione delle malattie trasmissibili tramite vettori animali

Titolo del progetto: PCR digitale: studio e sviluppo di tecniche e metodologie innovative applicate alla diagnostica molecolare in Sicurezza Alimentare e Sanità Animale.

Responsabile Scientifico: Bruna Vodret

Titolo del progetto: PCR digitale: studio e sviluppo di tecniche e metodologie innovative applicate alla diagnostica molecolare in Sicurezza Alimentare e Sanità Animale.

Durata del progetto (espressa in mesi): 24

Area tematica: Macro Obiettivo 10 Rafforzare le attività di prevenzione in sicurezza alimentare e sanità pubblica veterinaria per alcuni aspetti di attuazione del Piano Nazionale Integrato dei Controlli Programmi regionali: P - 10.1 Integrazione dei controlli sulla sicurezza alimentare; P - 10.3 Gestione delle emergenze epidemiche e non epidemiche P - 10.4 Prevenzione delle malattie trasmissibili tramite vettori animali

Responsabile scientifico del progetto: BRUNA VODRET

Cognome: Vodret

Nome: Bruna

Qualifica: Dirigente Chimico

Telefono 079/2892332 Fax 079/2892324

E-mail: bruna.vodret@izs-sardegna.it

Elenco dei Laboratori partecipanti al progetto:

- Laboratorio Controllo Mangimi, responsabile dr.ssa Bruna Vodret
- Laboratorio di Malattie Esotiche, responsabile dr.ssa Annalisa Oggiano
- Laboratorio di Virologia, responsabile dr.ssa Giantonella Puggioni

CURRICULUM VITAE ET STUDIORUM Bruna Vodret

Nata a Sassari 20/02/62. Laurea in **Chimica** conseguita presso l'Università di Sassari nel marzo 1987

Dal 2 Aprile 1991 ad oggi dipendente presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna in qualità di Assistente Chimico. Dal Gennaio 1998 Responsabile del Laboratorio Controllo Mangimi del Dipartimento Igiene degli Alimenti. La sua attività nel suo attuale reparto riguarda il controllo chimico degli alimenti, dei mangimi e delle acque ad uso zootecnico.

Dal 1996 ad oggi si occupa di identificazione di proteine animali nei mangimi con metodi microscopici, tecniche immuno-enzimatiche e biomolecolari nell'ambito delle misure urgenti per la prevenzione della BSE.

Da Febbraio 2000 si occupa di messa a punto di metodi di analisi biomolecolari come PCR qualitativi e quantitativi per il monitoraggio di DNA ricombinato negli alimenti ad uso umano e zootecnico.

Dal 2006 si occupa della problematica relativa allo studio delle sostanze "allergeniche negli alimenti mediante applicazione di tecniche immuno-enzimatiche e biomolecolari.

Dal 2011 si occupa della problematica relativa allo studio delle impurità solide degli alimenti di origine animale e vegetale.

Partecipa regolarmente a circuiti interlaboratoriali nazionali ed internazionali nell'ambito delle prove che si effettuano in laboratorio ed è impegnata nella formazione interna ed esterna relativamente agli argomenti di cui si occupa.

ATTIVITÀ DI STUDIO E RICERCA:

Responsabile di Unità Operativa nei progetti di Ricerca Corrente del Ministero della Salute (2007) "Definizione di un software per il riconoscimento dei costituenti di origine animale negli alimenti per animali". (2008) "Un nuovo approccio alla quantificazione di costituenti animali nei mangimi: studio comparato tra la microscopia FT- NIR, la microscopia ottica e metodiche di biologia molecolare"

Responsabile di Unità Operativa nel progetto di Ricerca finalizzata del Ministero della Salute (2009) "Development of guidelines, management systems and new methodologies for GMOs traceability, own-checks procedures and official control in the food and feed supply chain with respect to EU legal requirements".

Responsabile di Unità Operativa di Ricerca Corrente del Ministero della Salute IZS SI 11/11: Pacchetto igiene: valutazione di metodiche analitiche per la determinazione di impurità solide (filth test) in prodotti di filiera regionale. Studio di tecniche innovative per l'identificazione delle impurità contaminanti.

Responsabile scientifico del progetto di Ricerca Corrente IZS SA 03 /12 RC "Messa a punto di sistemi di PCR Real Time per l'identificazione di proteine animali trasformate (PAPs) derivate da specie non ruminanti".

PARTECIPAZIONE A RIUNIONI CONVEGNI E SEMINARI

Partecipazione come docente e discente regolarmente ai Workshop Nazionali presso i Centri di Referenza proteine animali trasformate (CREAA) e organismi geneticamente modificati (CROGM).

PUBBLICAZIONI:

- Maria Rita Schiavo · Claudia Manno · Antonina Zimmardi · **Bruna Vodret** · Maria Giovanna Tilocca · Serena Altissimi · Naceur M. Haouet Foreign bodies in dried mushrooms marketed in Italy. *Italian Journal of Food Safety* 11/2015; 4(4). DOI:10.4081/ijfs.2015.4523
- Tilocca M.G., **Vodret B.**, Mancuso M.R., Zimmardi A., Manno C., Schiavo M.R.. Analysis of foreign matter in foodstuffs using the Light Filth Test: report 2012-2013. *Italian Journal of Food Safety* 09/2015; 4(3). DOI:10.4081/ijfs.2015.4504(2015)
- Tilocca M.G., Pischedda S., Serratrice G., Oggiano M.A., Haouet M.N., Marongiu E., **Vodret B.** Detection of swine meat and bone meal in animal feed by real-time PCR. 3rd EAVLD Congress Pisa, Italy, 12-15 October 2014.
- Tilocca M.G., **Vodret B.**, Mancuso M.R., Zimmardi A., Manno C., Schiavo M.R.. Analysis of foreign matter in foodstuffs using the Light Filth Test: report 2012-2013. XXIV CONVEGNO NAZIONALE AIVI Bologna 10-12 Settembre 2014
- Schiavo MR, Manno C., Zimmardi A., **Vodret B.**, Tilocca M.G., Altissimi S., Haouet M. N. Foreign bodies in dried mushrooms marketed in Italy using filth test. XXIV CONVEGNO NAZIONALE AIVI Bologna 10-12 Settembre 2014
- Tilocca M.G., Serratrice G., Oggiano M.A., Mancuso M.R., Mascia I., Marongiu E., **Vodret B.** Monitoring the presence of genetically modified potato EH92-527-1 (BPS-25271-9) in commercial processed food. *Italian Journal of Food Safety*, 3:1628;57-59, 2014.

- **Vodret B.**, Zidda C., Tilocca M.G., Usai K., Serratrice G., Fois P., Oggiano M.A., Orrù A. “Dati preliminari sulla potenziale presenza di OGM nella filiera biologica in Sardegna” II CONGRESSO NAZIONALE RIRAB – IX CONVEGNO ZooBioDi , 11-13 giugno 2014 Consiglio Nazionale delle Ricerche Aula Convegni P.le Aldo Moro 7, Roma
- Tilocca M.G., Caneglias E., Oggiano M.A., Serratrice G., Marongiu E., **Vodret B.** Identificazione di proteine animali trasformate (PAT) di suino mediante PCR Real Time. Dati preliminari. XV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., 23-25 Ottobre 2013, Monreale (PA).
- **Vodret B.**, Boi R., Tilocca M.G., Mereu M.G., Deiana A.M., Caneglias E., Saba B., Pisu R., Rosu V., Orrù A., Cabras P.A. Monitoraggio dei parametri chimico-fisici e dello stato trofico del Lago Alto Flumendosa, in Sardegna, in correlazione a fioriture di cianobatteri tossici. XXV Congresso Internazionale Ordine Nazionale Biologi Firenze (FI) – 17-19 Ottobre 2013 .
- Tilocca M.G., Serratrice G., Oggiano M.A., Mancuso M.R., Mascia I., Marongiu E., **Vodret B.** Monitoring the presence of genetically modified potato EH92-527-1 (BPS-25271-9) in commercial processed food. Short Communications, XXIII Convegno AIVI 2013, 12-14 giugno Roma.
- Mascia I, **Vodret B.**, Mancuso M.R., Serratrice G., Oggiano M.A., Marongiu E.. “Detection of genetically modified potato EH92-527-1 (BPS -25271-9) in food and feed products commercialized in Sardinia”. *Poster al 5th International Symposium on Recent Advances in food analysis*, 1-4 Novembre Praga 2011
- Marchis D, Amato G, **Vodret B.**, Haouet N, Schiavo R, Prudente C, Poma Genin E, Veys P, Abete M. Uno studio interlaboratorio per la quantificazione dei costituenti animali nei mangimi: dati preliminari. *Poster al convegno NutriMI 2011*
- Milia M., **Vodret B.**, Serratrice G, Soro B., Mancuso M.R.-“Three different extraction methods for detecting Roundup Ready soybean in processed food from the Italian market “ **International Journal of integrative biology**” 2008 Vol.3 No. 2 123-130
- **Vodret B.**, Milia M., Orani M.G., Serratrice G., Mancuso M.R.-“ Detection of GMOs in food and feed” **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 2008 3, No. 057
- **Vodret B.**, Milia M., Orani M.G., Serratrice G., Mancuso M.R.-“Detection of genetically modified organisms in food: Comparison among three different DNA extraction methods” **Veterinary Research Communications**, 31Suppl.1 385-388-2007.

1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

In molti aspetti della ricerca di base, in particolare test diagnostici, l'avvento delle tecnologie analitiche moderne ha fornito la capacità di rilevare e quantificare gli acidi nucleici bersaglio con una sensibilità e specificità senza precedenti. Al momento, la tecnica più comune per analizzare la presenza di acidi nucleici in campioni diagnostici sperimentali è la reazione a catena della polimerasi (PCR). Quando è necessaria l'analisi quantitativa, l'impiego della real-time PCR quantitativa (qPCR) è la tecnica d'elezione per la sua accuratezza e precisione. Tuttavia, il suo impiego in quantificazione può presentare rilevanti limitazioni quando il DNA bersaglio è presente a basse concentrazioni in campioni complessi; un'altra importante limitazione, che si traduce in una riduzione della sensibilità, è quella dovuta alla frequente presenza di inibitori co-estratti insieme al DNA di interesse dalle matrici complesse che possono inficiare l'efficienza di amplificazione.

La PCR digitale (dPCR) è un approccio molecolare di ultima generazione capace di misure precise e accurate, le cui performance in termini di applicabilità e sensibilità, evidenziano la massima efficienza di quantificazione del DNA target, senza la necessità di avere una curva di calibrazione e materiali di riferimento, riducendo i tempi e i costi di analisi.

Il principio di base della PCR digitale (dPCR) è quello di eseguire una quantificazione assoluta del DNA bersaglio presente in un campione, utilizzando diluizioni limitanti, l'amplificazione del DNA target e l'analisi dei risultati mediante la statistica di Poisson.

Nonostante i principi generali di tale tecnologia fossero noti da qualche tempo, solo di recente il mercato ha offerto sistemi in PCR digitale di ultima generazione ora in piena espansione, con due tipologie di piattaforme di dPCR che lavorano con due approcci differenti. La prima è la "chamber digital PCR" (cdPCR), un sistema basato su chip microfluidico di partizionamento del target in camera microfluidica, l'output è sempre la quantificazione assoluta del numero di copie di target e l'elaborazione dei dati secondo la statistica di Poisson; la seconda è la "droplet digital PCR" (ddPCR) che si basa sulla ripartizione del campione in migliaia di goccioline in un'emulsione olio-acqua, la successiva amplificazione dell'emulsione contenente il DNA target, infine l'analisi delle "droplet" contenenti il DNA target (positive) e non (negative) mediante la statistica di Poisson.

La droplet digital PCR è una tecnica sviluppata per fornire una quantificazione assoluta di DNA applicabile in vari ambiti sia della ricerca, che nella diagnostica clinica; è in grado di analizzare fino a diecimila repliche dello stesso campione, quindi particolarmente indicata per la ricerca di eventi rari. Altre applicazioni riguardano l'analisi di copy number variation (CNV), la quantificazione assoluta in espressione genica, numerose applicazioni in quantificazione assoluta in ambito batteriologico, virologico, e per la quantificazione di eventi geneticamente modificati, con evidenti vantaggi rispetto alla tradizionale real time PCR, tra cui il numero di ripetizioni parallele (da poche centinaia a migliaia per campione), la possibilità di condurre una quantificazione assoluta senza curve standard, e la ridotta sensibilità agli inibitori della PCR che interessano l'analisi DNA.

Di recente acquisizione, presso il nostro Ente, è la piattaforma digital droplet PCR, acquistata grazie alla collaborazione tra il laboratorio Controllo Mangimi e il laboratorio di Malattie Esotiche che hanno valutato le potenzialità della tecnologia individuando differenti problematiche e ambiti di applicazione in Sicurezza Alimentare e in Sanità Animale.

Per quanto riguarda la Sicurezza Alimentare, il Centro di Referenza Europeo per gli Organismi geneticamente modificati (EU-RL GMFF) ha dettato le linee di ricerca e sviluppo di metodi e tecnologie finalizzate all'armonizzazione dei controlli ufficiali degli OGM in alimenti e mangimi.

Il laboratorio Controllo Mangimi dell'IZS della Sardegna è stato il primo laboratorio italiano, insieme al Centro di Referenza Nazionale per gli OGM (CROGM), a studiare l'applicabilità della PCR digitale alla quantificazione diretta di eventi OGM, inserendosi coerentemente nelle disposizioni del Piano di controllo sugli OGM, nei quali è espressamente richiesto il miglioramento della copertura analitica per il rilevamento di eventi, autorizzati e non.

Questa primissima fase sperimentale ha comportato la partecipazione del laboratorio Controllo Mangimi al primo studio collaborativo interlaboratoriale nazionale del CROGM sull'identificazione in single e duplex della soia geneticamente modificata in PCR digitale. A livello internazionale, grazie all'esperienza acquisita, il laboratorio è stato invitato a prendere parte allo studio

collaborativo nell'ambito dell'European Union FP7 GMO Project Decathlon “*International inter-laboratory validation of a multiplex droplet digital PCR (ddPCR) method for the quantification of EU authorized genetically modified (GM) maize events*”, a cui parteciperanno undici laboratori europei competenti per la tecnica.

Per quanto riguarda le applicazioni in ambito virologico, la PCR digitale è una metodica di recente introduzione. I primi lavori in virologia umana risalgono ad anni recenti e riportano l'applicazione alla quantificazione dei virus dell'immunodeficienza umana (HIV), citomegalovirus (CMV), epatite A, B e C (HAV, HBV, HCV), papilloma virus (HPV), roseolovirus, adenovirus ed enterovirus. Ma l'applicazione di questa metodologia è in piena espansione poiché le Direttive Europee per la diagnostica in vitro (IVDD) promuovono la standardizzazione di metodi che utilizzino calibratori di cui si richiede la tracciabilità (ISO 17511). Nelle metodiche basate sulla quantificazione di acidi nucleici di patogeni, quali batteri e virus, non sono ancora disponibili materiali di riferimento i cui valori siano riconducibili al Sistema di Unità Internazionale (SI) e tantomeno procedure di misura di riferimento. L'ISO 17511 riconosce che per la determinazione quantitativa degli acidi nucleici di virus quali CMV, HIV e HBV sono disponibili degli standard internazionali (IS) dell'OMS, ma essi sono considerati tali per convenzione, poiché i valori ad essi assegnati sono definiti in modo arbitrario e non basati su un sistema di riferimento stabile.

In campo veterinario solo di recente, nel 2015, la PCR digitale è stata utilizzata per quantificare il DNA del circovirus suino di tipo 2. Non esistono quindi lavori sui principali virus che colpiscono il patrimonio zootecnico sardo.

2. Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

Il progetto intende realizzare un miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia del controllo analitico in Sicurezza Alimentare e Sanità Animale attraverso l'attuazione di nuove strategie e lo sviluppo di metodologie molecolari innovative applicate alla diagnostica molecolare. I risultati ottenuti in termini di competenze acquisite o potenziate, potranno essere utilizzati in altri ambiti degli stessi laboratori o in altri settori diagnostici di questo Ente.

La messa a punto di nuove strategie analitiche, con l'impiego della PCR digitale, nel controllo degli OGM e nella diagnostica virologica, consentirà di quantificare la più piccola copia di DNA target con la massima efficienza e accuratezza, con evidenti vantaggi rispetto alla tradizionale PCR real time, tra cui: il numero di ripetizioni parallele (da poche centinaia a migliaia per campione), la possibilità di condurre una quantificazione assoluta senza curve standard, una ridotta sensibilità agli inibitori della PCR.

Il presente progetto propone l'applicazione della PCR digitale alla diagnostica molecolare in Sicurezza Alimentare e Sanità Animale con i seguenti obiettivi:

a) Sicurezza Alimentare - Ricerca e quantificazione di organismi geneticamente modificati

Relativamente gli OGM, in accordo con le linee di ricerca e sviluppo di metodi e tecnologie del Centro di Referenza Europeo per gli Organismi geneticamente modificati (EU-RL GMFF) si intende ampliare gli strumenti analitici, migliorare il controllo del numero di eventi GM rilevati e quantificati, rispondere tempestivamente ai rapidi mutamenti del quadro autorizzativo europeo e far fronte all'identificazione di eventi non autorizzati mediante strumenti scientifici innovativi.

Pertanto sarà valutata l'applicabilità e la trasferibilità dei singoli metodi qualitativi e quantitativi in rtPCR in formato PCR digitale. Si procederà allo studio di applicabilità a matrici complesse, in cui la presenza di fattori inibenti può modificare l'attendibilità del risultato quantitativo, e alla successiva messa a punto dei protocolli in ddPCR.

Verranno valutate le possibilità di costruire sistemi multi-screening in ddPCR per la simultanea rilevazione di elementi di screening; messa a punto di protocolli in multiplex per l'implementazione della copertura analitica di eventi OGM (eventi autorizzati e non). La possibilità di rilevare e quantificare eventi OGM in sistemi in multiplex riduce i costi e i tempi di analisi, tutt'oggi eseguite per singolo elemento di screening e per singolo evento GM. Inoltre, per le metodiche in analisi saranno verificate la sensibilità, specificità, definiti i limiti di rilevabilità e di quantificazione;

verifica della variabilità intra e inter assay, e la definizione e la valutazione dei criteri di prestazione dei metodi.

Studi di validazione interna verranno condotti al fine di valutare percorsi di accreditamento che porteranno ad una armonizzazione dei controlli ufficiali degli OGM in alimenti e mangimi.

b) Sanità Animale –Quantificazione di virus a scopo diagnostico e di ricerca

La PCR digitale rappresenta un utile mezzo per l'analisi quantitativa di alcuni virus di particolare interesse come quello della bluetongue (BTV), della peste suina africana (PSA) e del circovirus del suino di tipo 2 (PCV2) che attualmente vengono identificati presso i laboratori di malattie esotiche e di virologia utilizzando Real Time PCR specifiche per ciascun target. Le metodiche per l'identificazione di BTV e di PSA sono conformi a quelle pubblicate sul Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals O.I.E., permettono di dare un risultato di presenza-assenza del genoma virale e, dopo validazione secondaria, sono state accreditate secondo la norma 17025/2005. E' possibile utilizzare le real time PCR sopra descritte per la quantificazione virale attraverso la costruzione di curve standard che utilizzino DNA/RNA plasmidico o RNA/DNA estratto da virus a titolo noto. I punti critici di questo approccio sono la difficoltà di sintetizzare dei plasmidi, soprattutto a RNA, la loro scarsa stabilità, l'eccessiva variabilità nella quantificazione tra una determinazione e l'altra e la necessità di introdurre la curva standard per ogni determinazione, con aumento dei costi e del rischio di cross contaminazione. La PCR digitale permette di superare i limiti della PCR Real Time, migliorando l'attendibilità dei risultati in termini di sensibilità e riproducibilità. Infatti, la PCR digitale, essendo un metodo di quantificazione diretta, non è legata alla costruzione di una curva standard da cui estrapolare, in maniera indiretta, i valori quantitativi dei campioni esaminati. L'accuratezza della digital è talmente elevata che una delle sue applicazioni è la quantificazione e certificazione degli standard da utilizzare in Real Time PCR quantitativa. Scopo di questo progetto è l'applicazione della digital PCR nella quantificazione virale, sia per fini diagnostici che di ricerca. Nella diagnostica, essa può essere utilizzata per la determinazione della presenza del virus a basso titolo, come nelle fasi iniziali e finali delle infezioni; per dare un esito conclusivo nei campioni dubbi e per quantificare la carica virale al fine di valutare il reale stato di malattia o di infettività del soggetto. A scopo di ricerca può essere applicata alla quantificazione e al monitoraggio delle infezioni sperimentali da BTV, come previsto nella ricerca corrente IZSSA01/13 attualmente in corso, ed all'analisi di campioni prelevati da animali sieropositivi per PSA risultati virus negativi con la Real Time PCR. Può inoltre essere di grande aiuto nel formulare una diagnosi precisa in quei campioni che presentano un bassissimo titolo virale e contenendo poche copie di DNA virale non consentono di formulare una diagnosi precisa. La PCR digitale può superare i problemi che nascono nella quantificazione in matrici complesse in cui la presenza di fattori inibenti può modificare l'attendibilità del risultato quantitativo.

La proposta di progetto prevede lo sviluppo in parallelo degli obiettivi sopra descritti. L'attuazione degli stessi sarà resa possibile dalla stretta collaborazione tra il laboratorio Controllo Mangimi e i laboratori di Malattie Esotiche e di Virologia, per i quali lavoreranno rispettivamente le dott.sse Silvia Dei Giudici e Angela Maria Rocchigiani, biologhe specialiste con elevate competenze in biologia molecolare e specificatamente in Peste Suina Africana e Blue Tongue. Con il laboratorio Controllo Mangimi è già in corso una stretta attività consultiva e di programmazione per lo sviluppo delle applicazioni della tecnologia. La trasversalità delle competenze rappresenta il valore aggiunto di questo progetto.

3. Metodologia

a) Sicurezza Alimentare

Laboratorio Controllo Mangimi

1. Studio di applicabilità e trasferibilità dei metodi OGM qualitativi e quantitativi esistenti, in un formato PCR digitale; valutazione quali-quantitativa del DNA, analisi in silico di primer e sonde, ottimizzazione delle concentrazioni di primer e sonde e/o disegno di nuovi saggi; determinazione della temperatura di annealing in gradiente; confronto diretto con rtPCR, test su materiali di riferimento (MR) e campioni provenienti dai proficiency test (PT).
2. Messa a punto di protocolli ddPCR per lo studio di applicabilità a matrici complesse tramite verifica dei parametri definiti al punto 1, applicazione a campioni alimenti e mangimi pervenuti in laboratorio.
3. Messa a punto di protocolli di PCR digitale in multiplex (elementi di screening ed eventi di mais e soia): costruzione di protocolli di ddPCR in duplex e triplex, analisi dati quantitativi e confronto diretto con il rispettivo protocollo in single. Ottimizzazione della reazione multiplex ddPCR.
4. Definizione dei limiti di rilevabilità e dei limiti di quantificazione: attraverso diluizioni seriali del campione analizzati con un numero significativo di replicati. Confronto con la rtPCR.
5. Valutazione della sensibilità e specificità dei metodi.
6. Miglioramento della variabilità intra e inter assay.
7. Definizione e valutazione dei criteri di prestazione dei metodi.
8. I protocolli in PCR digitale che soddisfano i criteri sopraindicati saranno sottoposti a studi di validazione interna e alla valutazione di percorsi di accreditamento.

b) Sanità Animale

Laboratorio di Virologia

1. Standardizzazione della digital RT-PCR per i sierotipi 1-26 di BTV con primer e sonda utilizzati per la Real Time, in singolo e in duplex per la contemporanea determinazione del controllo interno esogeno (E-IPC). La standardizzazione avverrà tramite valutazione delle concentrazioni ottimali di primers e sonde e della miglior temperatura di annealing.
2. Valutazione comparativa delle performance della real time RT-PCR in uso e della digital RT-PCR standardizzata
3. Verifica dell'applicabilità della digital PCR a campioni di campo, matrici difficili o a campioni a basso titolo.
4. Messa a punto di una metodica per la quantificazione degli standard da utilizzare nelle Real Time PCR per ovine herpesvirus di tipo 2 (OvHV-2), bovine herpesvirus di tipo 1 (BoHV-1) e caprine herpesvirus di tipo 1 (CpHV-1).

Laboratorio di Malattie Esotiche

5. Standardizzazione di due digital PCR per PSA con primers e sonde corrispondenti alle real time PCR "King" e "UPL" attualmente in uso presso il laboratorio. La standardizzazione avverrà secondo quanto riportato al punto 1.
6. Valutazione comparativa delle performance della real time PCR in uso e delle due digital PCR standardizzate.
7. Verifica dell'applicabilità della digital PCR a campioni di campo, matrici difficili o a campioni a basso titolo.
8. Messa a punto di una metodica per la quantificazione degli standard da utilizzare nella Real Time PCR per Circovirus suino di tipo 2 (PCV-2).

Per entrambi i laboratori, le PCR digitali che abbiano dimostrato sensibilità, specificità e riproducibilità superiore delle rispettive real time PCR quantitative saranno sottoposte a validazione interna ed eventuale accreditamento.

4. Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire

I risultati ottenuti saranno resi disponibili e fruibili:

- 1) I protocolli e i risultati ottenuti dalla messa a punto delle metodiche di PCR digitale potranno essere utilizzati come strumenti di supporto tecnico-scientifico per gli operatori coinvolti nella ricerca di OGM e nella diagnostica virologica.
- 2) Pubblicazioni su riviste specializzate e comunicazione in convegni scientifici, e/o tramite web.

5. Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Il coinvolgimento di competenze specifiche, nell'ambito di questa ricerca contribuirà ad apportare contributi scientifici specifici per la realizzazione di metodiche diagnostiche innovative, garantendo un approccio multidisciplinare, attraverso il coinvolgimento di competenze trasversali.

Inoltre, la messa a punto di protocolli analitici con la tecnologia PCR digitale, presente ancora solo in pochi laboratori, ha bisogno di un'intensa attività consultiva, sia per uniformare l'attività di ricerca che per contribuire alla distribuzione e divulgazione di strumenti analitici innovativi.

6. Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione

I risultati del progetto saranno resi disponibili tramite:

1. comunicazioni orali e poster in occasione di convegni scientifici;
2. pubblicazioni a stampa su riviste specializzate del settore;
3. pubblicazioni sui siti internet degli IZZSS e Centri di Referenza Nazionali;
4. protocolli analitici e strumenti operativi di supporto per gli ambiti analizzati

7. Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti

Verranno organizzate riunioni periodiche nelle quali si verificherà la coerenza dei lavori svolti in itinere in relazione agli obiettivi e, ovviamente, verranno affrontati specifici approfondimenti tematici;

Verranno stesi dei report intermedi con lo scopo di verificare lo stato di avanzamento della ricerca. Alla fine del biennio di lavoro verranno analizzati i dati ottenuti, stesa la relazione finale e discussa la opportunità di presentare i risultati conseguiti alla comunità scientifica e istituzionale di riferimento; in tal caso verranno presentate comunicazioni a convegni nazionali ed internazionali e i lavori verranno pubblicati in riviste scientifiche nazionali ed internazionali. La pubblicità delle ricerche svolte, oltre che comprovare l'avvenuto svolgimento delle stesse, consente di raccogliere feedback utili per il loro ulteriore sviluppo e miglioramento.

Cronogramma del progetto

a) Sicurezza Alimentare

Controllo Mangimi

Wp 1. Studio di applicabilità e trasferibilità dei metodi OGM qualitativi e quantitativi esistenti, in un formato PCR digitale; valutazione quali-quantitativa del DNA, analisi in silico di primer e sonde, ottimizzazione delle concentrazioni di primer e sonde e/o disegno di nuovi saggi; determinazione della temperatura di annealing in gradiente; confronto diretto con rtPCR, test su materiali di riferimento (MR) e campioni provenienti dai proficiency test (PT).

Wp 2. Messa a punto di protocolli ddPCR per lo studio di applicabilità a matrici complesse tramite verifica dei parametri definiti al WP1, applicazione a campioni alimenti e mangimi pervenuti in laboratorio.

Wp 3. Messa a punto di protocolli di PCR digitale in multiplex (elementi di screening ed eventi di mais e soia): costruzione di protocolli di ddPCR in duplex e triplex, analisi dati quantitativi e confronto diretto con il rispettivo protocollo in single. Ottimizzazione della reazione multiplex ddPCR.

Wp 4. Definizione dei limiti di rilevabilità e dei limiti di quantificazione: attraverso diluizioni seriali del campione analizzati con un numero significativo di replicati. Confronto con la rtPCR;

Wp 5. Valutazione della sensibilità e specificità dei metodi.

Wp 6. Miglioramento della variabilità intra e inter assay.

Wp 7. Definizione e valutazione dei criteri di prestazione dei metodi.

Wp 8. I protocolli in PCR digitale che soddisfano i criteri sopraindicati, saranno sottoposti a studi di validazione interna e alla valutazione di percorsi di accreditamento.

b) Sanità Animale

Laboratorio di Virologia

Wp 9. Standardizzazione della digital RT-PCR per i sierotipi 1-26 di BTV con primer e sonda utilizzati per la Real Time, in singolo e in duplex per la contemporanea determinazione del controllo interno esogeno (E-IPC). La standardizzazione avverrà tramite valutazione delle concentrazioni ottimali di primers e sonde e della miglior temperatura di annealing.

Wp 10. Valutazione comparativa delle performance della real time RT-PCR in uso e della digital RT-PCR standardizzata.

Wp 11. Verifica dell'applicabilità della digital PCR a campioni di campo, matrici difficili o a campioni a basso titolo.

Wp 12. Messa a punto di una metodica per la quantificazione degli standard da utilizzare nelle Real Time PCR per ovine herpesvirus di tipo 2 (OvHV-2), bovine herpesvirus di tipo 1 (BoHV-1) e caprine herpesvirus di tipo 1 (CpHV-1).

Laboratorio di Malattie Esotiche

Wp 13. Standardizzazione di due digital PCR per PSA con primers e sonde corrispondenti alle real time PCR "King" e "UPL" attualmente in uso presso il laboratorio. La standardizzazione avverrà secondo quanto riportato al WP 9.

Wp 14. Valutazione comparativa delle performance della real time PCR in uso e delle due digital PCR standardizzate.

Wp 15. Verifica dell'applicabilità della digital PCR a campioni di campo, matrici difficili o a campioni a basso titolo

Wp 16. Messa a punto di una metodica per la quantificazione degli standard da utilizzare nella Real Time PCR per Circovirus suino di tipo 2 (PCV-2).

Wp 17. Per entrambi i laboratori, le PCR digitali che abbiano dimostrato sensibilità, specificità e riproducibilità superiore delle rispettive real time PCR quantitative saranno sottoposte a validazione interna ed eventuale accreditamento.

Fasi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
WP1	x	x	x	x	x	x																		
WP2					x	x	x	x	x	x														
WP3								x	x	x	x	x	x											
WP4												x	x	x	x									
WP5															x	x	x	x	x					
WP6																	x	x	x	x				
WP7																			x	x	x	x		
WP8																			x	x	x	x	x	x
WP9	x	x	x	x	x	x																		
WP10					x	x	x	x	x	x														
WP11								x	x	x	x	x	x											
WP12												x	x	x	x	x	x							
WP13	x	x	x	x	x	x																		
WP14						x	x	x	x	x	x													
WP15									x	x	x	x	x	x										
WP16													x	x	x	x	x	x						
WP17																			x	x	x	x	x	x

Tabella n. 1 (compilare solo per la voce “Borse di Studio”)

Titolo del progetto:

Durata del progetto (espressa in mesi): **24**

Responsabile scientifico Cognome

Nome

VOCE DI SPESA	Importo	Descrizione
Borsa di studio		Biologo con Specializzazione in Scienza dell’Alimentazione, con comprovata esperienza in tecniche di biologia molecolare applicate alla Sanità Animale e Sicurezza Alimentare. Comprovata esperienza in PCR digitale, in particolare applicata alla ricerca molecolare di OGM. Applicazione di Procedure Operative previste nel Sistema di Gestione per la Qualità dell’Ente secondo la norma UNI CEI EN/ISO/IEC 17025.

Firma del Responsabile Scientifico del progetto

