P080

BATTERIOLOGIA

IMPIEGO DI DIGITAL PCR NEL PROTOCOLLO DI VALIDAZIONE DELLE PERFORMANCE ANALITICHE DI UN SAGGIO LAMP PER LA RILEVAZIONE DI MYCOPLASMA GENITALIUM

M.E. Turba [3], C. Andreozzi [3], A. Grassi [2], F. Gentilini [1]
[1]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Bologna, Italia*
[2]*I-Vet Diagnostica Veterinaria, Flero- Brescia*
[3]*Xenturion Diagnostics, Forlì, Italia*

INTRODUZIONE

Mycoplasma genitalium è considerato tra i patogeni di più frequente riscontro in corso di patologie infiammatorie del tratto genito-urinario. L'identificazione di tale microrganismo si avvale tradizionalmente di metodi microbiologici che, per le caratteristiche colturali di questi batteri, richiedono lunghi tempi di esecuzione. I metodi di biologia molecolare come la PCR e le tecniche di amplificazione isotermica quali la LAMP, rappresentano valide alternative diagnostiche riducendo i tempi di risposta. Nel procedimento di validazione di queste tecniche ha un'importanza critica l'utilizzo di standard analitici adeguati alle tecniche molecolari allestiti da ceppi batterici di riferimento. In tempi recenti si sta affermando una nuova tecnica, detta digital PCR (dPCR), che consente la quantificazione assoluta ed accurata del numero di target presenti in un campione, che può pertanto essere considerato standard di riferimento.
Lo scopo del presente studio è quello di valutare l'utilità e la fattibilità dell'impiego di dPCR per allestire uno standard di riferimento a concentrazione nota di M.genitalium da un campione di campo conservato in ESwab™ (Copan). Tale standard è utilizzato per validare le performance analitiche in termini di sensibilità analitica misurata come limit of detection (LOD) di un saggio LAMP sviluppato con uno speciale buffer proprietario ed un innovativo disegno delle sonde.

METODI

Lo standard analitico è rappresentato da DNA genomico estratto da un ceppo di campo di M.genitalium identificato mediante saggio diagnostico PCR e confermato con sequenziamento parziale del gene 16s rRNA.
Il gDNA è stato purificato mediante Kit commerciale automatizzato su processatore a biglie magnetiche. Il gDNA è stato poi aliquotato e congelato a -70°C. Un'aliquota è stata scongelata ed è stata preparata una serie di diluizioni seriali in base 10, che sono state sottoposte a dPCR in duplicato. Il saggio dPCR è risultato lineare e la concentrazione dello standard è risultata pari a 339,6 copie/reazione. Lo standard a concentrazione nota è stato quindi diluito e testato con il saggio LAMP per la determinazione del LOD.

RISULTATI

Il LOD del saggio LAMP per M. genitalium è risultato pari a 2.5 copie/μL.
Si è inoltre provveduto a valutare la specificità del saggio LAMP analizzando un pannello di 12 isolati batterici di possibile riscontro nel microbiota genitale. In questo caso, poiché gli standard non erano utilizzati per valutare il LOD, si è proceduto con la quantificazione del gDNA mediante metodo fluorimetrico e stima dei GE secondo formula matematica GE=concentrazione gDNA/PM calcolato genoma, diluiti così da ottenere concentrazioni di GE pari a circa 10^6/μL.
La specificità analitica calcolata per ciascuno dei quattro saggi è risultata pari al 100%.

CONCLUSIONI

La metodica di dPCR si è dimostrata estremamente utile e pratica nella conduzione delle prove di validazione, e ha permesso di poter determinare in modo accurato il LOD del saggio LAMP. Al contrario, per le prove di specificità la minore accuratezza richiesta nel processo di validazione si è ritenuto sufficiente stimare la quantità di target mediante quantificazione fluorimetrica del gDNA e calcolo dei GE.