

Borney M. Francesca, Bryer Joëlle, De Lorenzi Daniela, Mobili Livia - ARPA Valle d'Aosta (Italia)

SCOPO DEL LAVORO

Valutare l'utilizzo di un metodo analitico molecolare (PCR Real Time) accreditato come screening qualitativo.

Obiettivo:

Discriminare velocemente i campioni positivi da quelli negativi, ottimizzando i tempi di risposta e le risorse.

MATERIALI E METODI

Analizzati 186 campioni naturali o contaminati in laboratorio

Metodica molecolare
(ISO/TS 12869:2012)

Metodica colturale
(ISO 11731:2017)

Concentrazione del campione
per filtrazione

Estrazione acidi
nucleici
lisi alcalina con
shock termico

PCR Real-Time

probes marcati con fluorofori che emettono fluorescenza solo dopo ibridazione con acido nucleico

Step 1		Water or water derived from water related matrices eg. swabs, biofilm, sediments											
		Matrix A				Matrix B				Matrix C			
		Water with low background (see 8.4.2 and 8.4.3)				Water with high background (see 8.4.4)				Water with extremely high background (see 8.4.5)			
		eg. potable water				eg. cooling tower, process water, water from air washers chambers, water from dental units				eg. waste water, surface water			
Step 2		Culture media											
Step 3		Procedure											
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Direct plating	Without treatment	1	R	R	O	O	R	O	R	O	O	R	O
	Heat treatment	2	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	Acid treatment	3	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Membrane filter on plate	Combination of heat/acid treatment	4											
	Without treatment	5	R	R	O	O	O	O	R	O	O	O	R
	Heat treatment	6	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Filtration with washing procedure	Acid treatment	7	O	R	O	O	O	O	O	R	O	O	O
	Without treatment	8	R	R	O	O	O	O	R	O	O	O	R
	Heat treatment	9	R	R	O	O	O	O	R	O	O	O	R
Plating after dilution	Acid treatment	10	R	R	O	O	O	O	R	O	O	O	R
	Without treatment	11	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	Heat treatment	12	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Combination of heat/acid treatment	Without treatment	13	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	Acid treatment	14	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

ISO 11731:2017 - Figure J.1 - Decision matrix

Metodo alternativo.
Rileva anche cellule stressate e non coltivabili

Costo elevato della strumentazione

Tempi di risposta molto brevi
4 - 6 ore

Metodo non operatore dipendente
Oggettivo

Metodo di riferimento.
Rileva cellule vitali e coltivabili

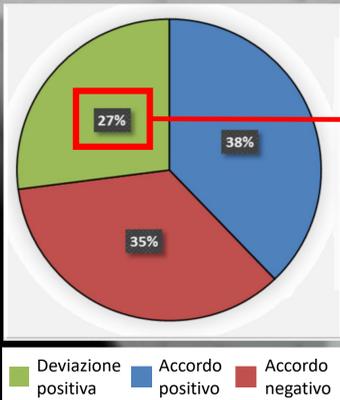
Complesso
14 procedure
3 diversi terreni colturali

Lungo nei tempi di risposta
10 giorni per risultato definitivo

Metodo fortemente operatore dipendente
Soggettivo

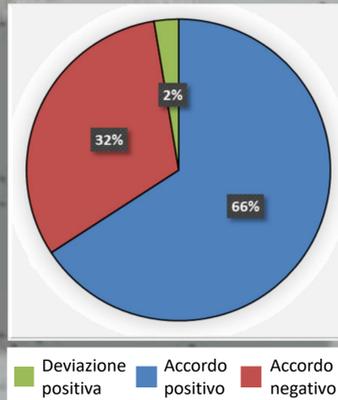
RISULTATI

Campioni naturali



Nei campioni naturali l'82,5% della deviazione positiva è riferibile a campioni con bassa contaminazione Ct ≥ 34 (circa 10² ufc/l)

Campioni artificiali



Dovuta a

Limiti di rilevabilità diversi a seconda del metodo

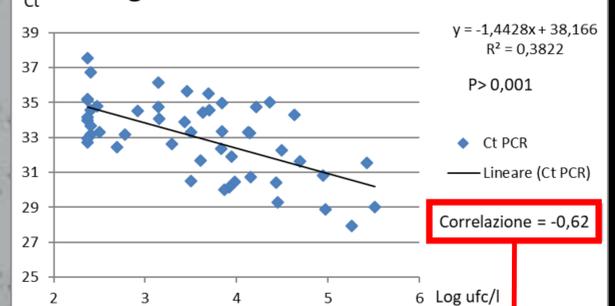
Presenza di elevata flora interferente

Presenza di Legionelle vitali, ma non coltivabili, nei campioni ambientali

%	Accuratezza	Sensibilità (PCR)	Sensibilità (metodo colturale)	Specificità (PCR)	Accordo negativo	Accordo positivo
Campioni totali	78	100	66	61	100	66
Campioni naturali	73	100	58	57	100	58
Campioni artificiali	97	100	96	92	100	96

Calcoli eseguiti secondo la ISO 16140-2:2016 e il documento DT-07-DL/DS (ACCREDIA)

Regressione lineare e correlazione



Il ciclo soglia (Ct) è correlato negativamente alla concentrazione di Legionella nel campione (Log ufc/l)

CONCLUSIONI

Si conferma la possibilità di utilizzare la PCR come screening dei campioni negativi (procedura utilizzata di routine nella microbiologia alimentare)

Significativa riduzione del tempo di risposta (4-6 ore per un campione negativo, contro 10 giorni del metodo colturale)

Il metodo molecolare ha evidenziato buone caratteristiche di performance

La buona correlazione tra ciclo soglia della PCR (Ct) e la concentrazione di Legionella nel campione consente una scelta mirata delle procedure da applicare nel metodo colturale (ISO 11731:2017 -Decision matrix)

Ottimizzazione delle risorse umane e riduzione del consumo di reattivi e plastica monouso

La metodica molecolare non è ancora considerata come utilizzabile di routine nelle Linee Guida. Questo comporta una difficoltà nell'interpretazione dei risultati e nel loro utilizzo per eventuali azioni correttive da intraprendere.