



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Giornate di aggiornamento sulle procedure di Microbiologia degli Alimenti **II modulo:**

Impiego dei metodi molecolari nella sicurezza alimentare



Analisi critica dei risultati

4-5 maggio 2017

Paola De Santis



Interpretazione dei risultati

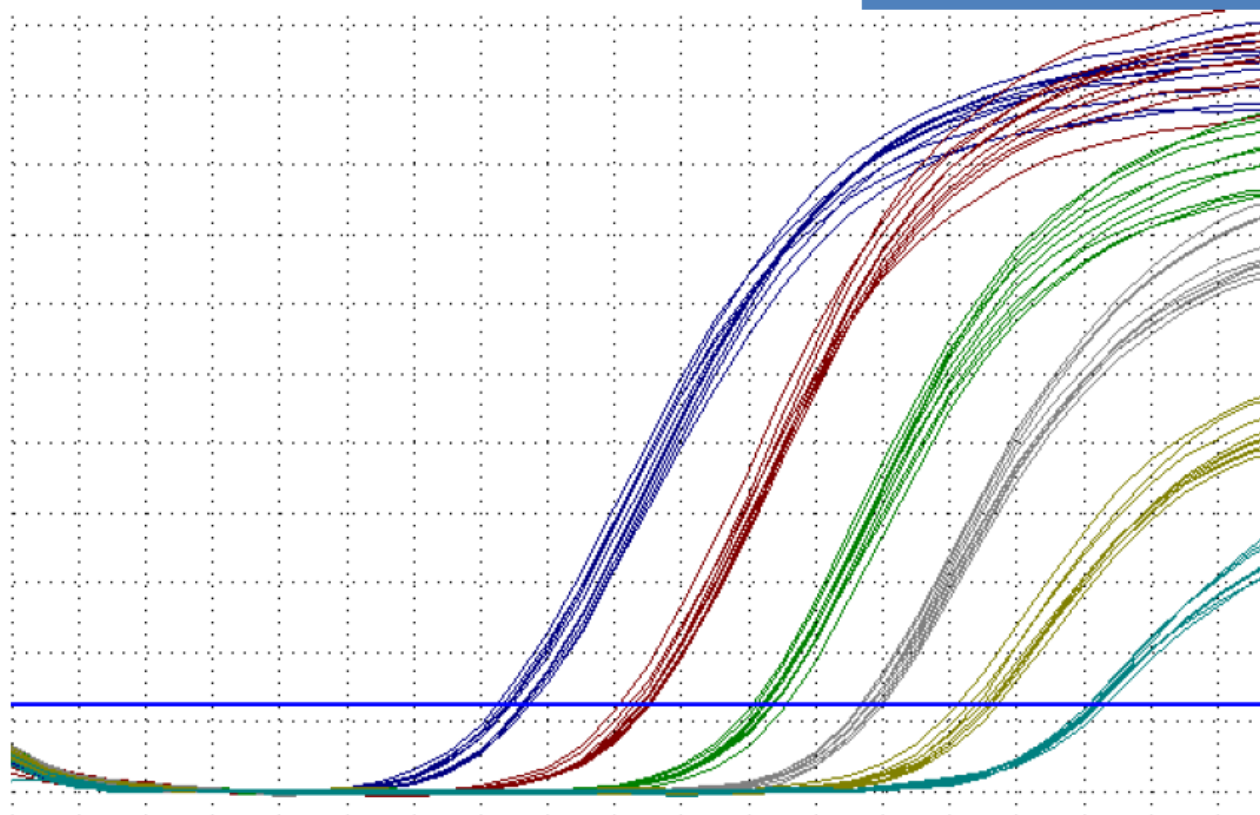
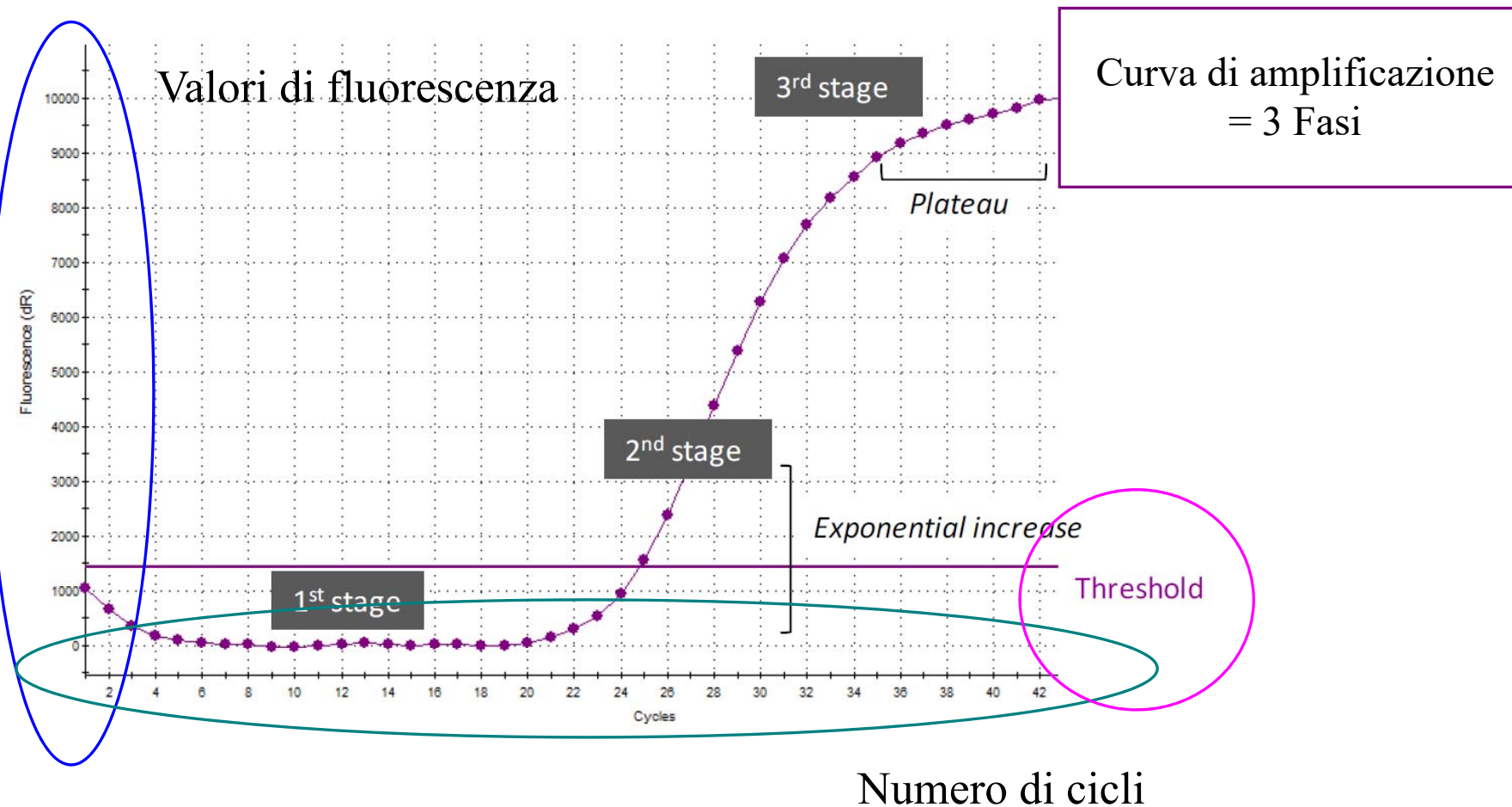
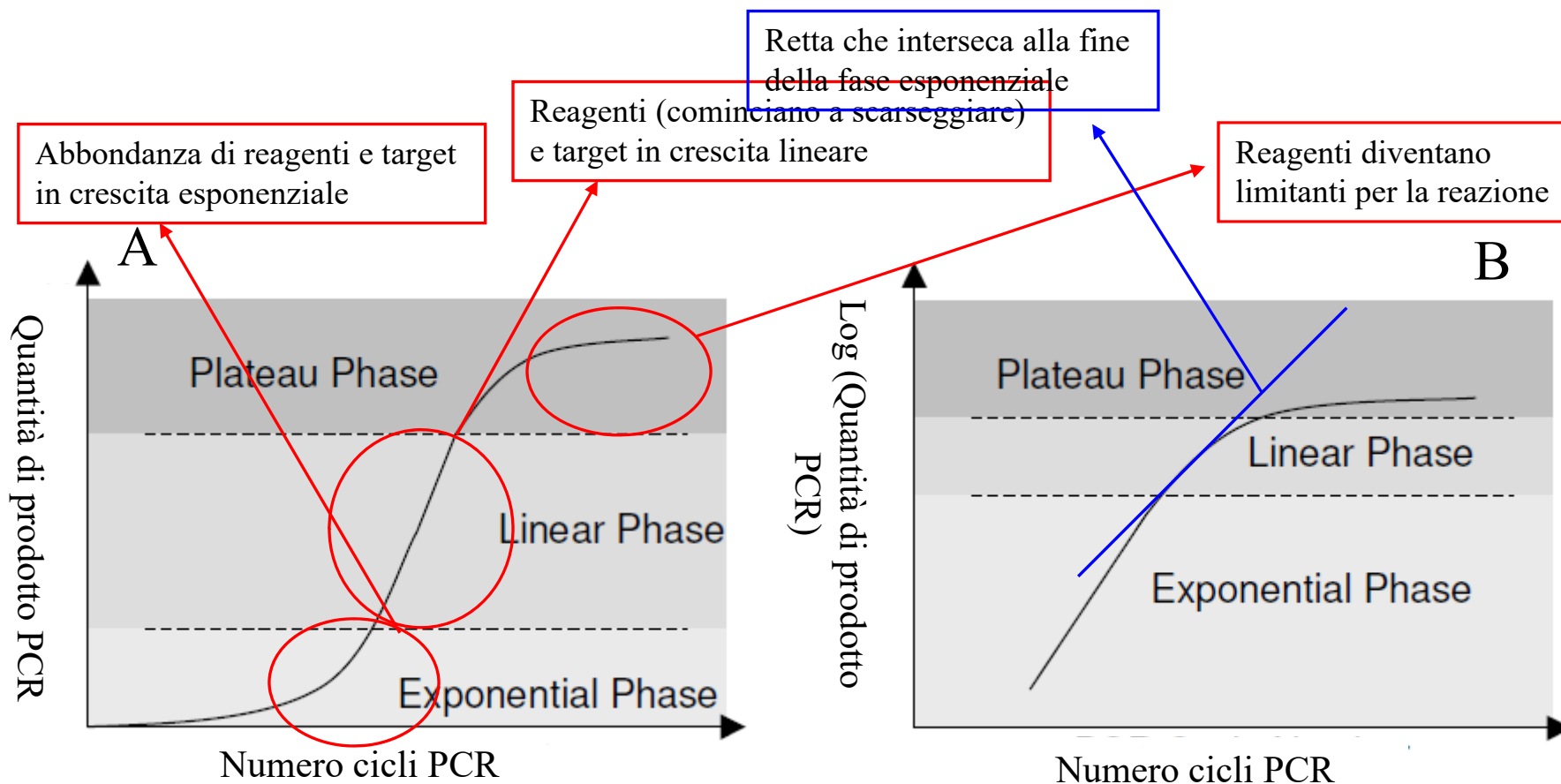


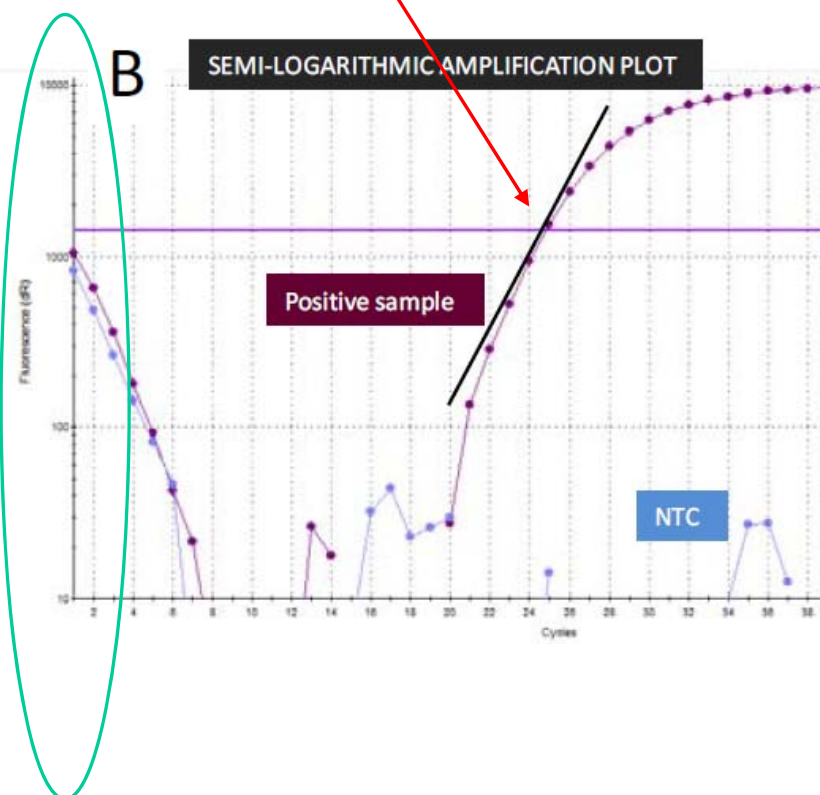
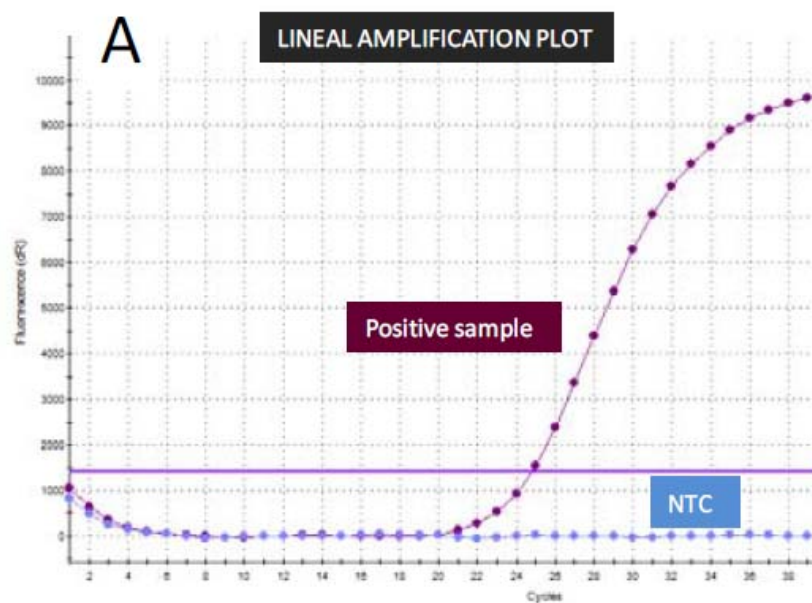
Grafico dell'amplificazione "real time" mediante uso di fluorofori



Fasi della reazione Real-time PCR



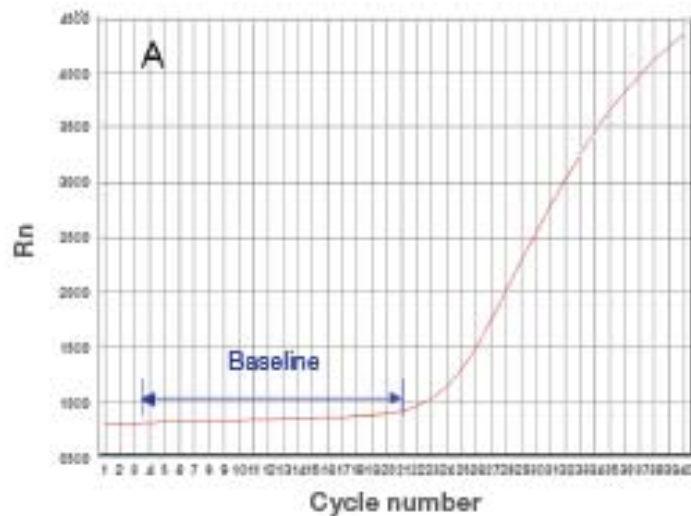
Facilita il posizionamento della Threshold



Valore logaritmico dell'asse delle Y



Fattori da considerare per l'analisi

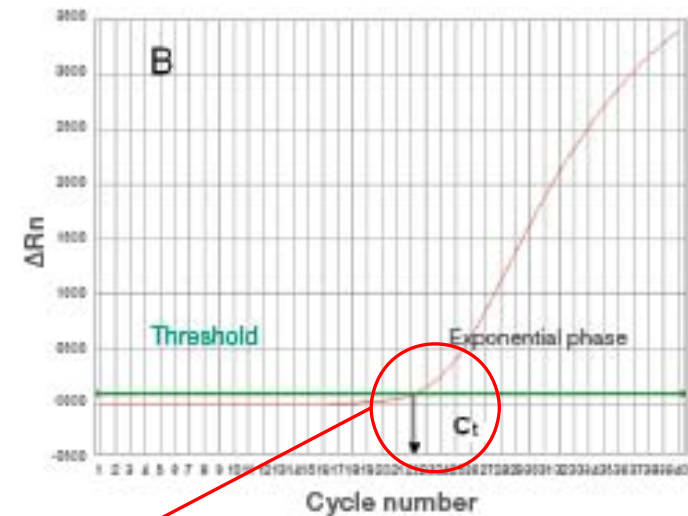


Linea di base o Baseline:

R_n = valore di fluorescenza

Ciclo soglia o C_t :

C_t = intersezione tra la linea di amplificazione e la threshold



Linea soglia o threshold:

ΔR_n = R_n - baseline

E' il livello di ΔR_n utilizzato per determinare il ciclo soglia (C_t) in un saggio di real time



Cosa è il Ct?

Misura relativa della concentrazione del target

Può essere influenzato:

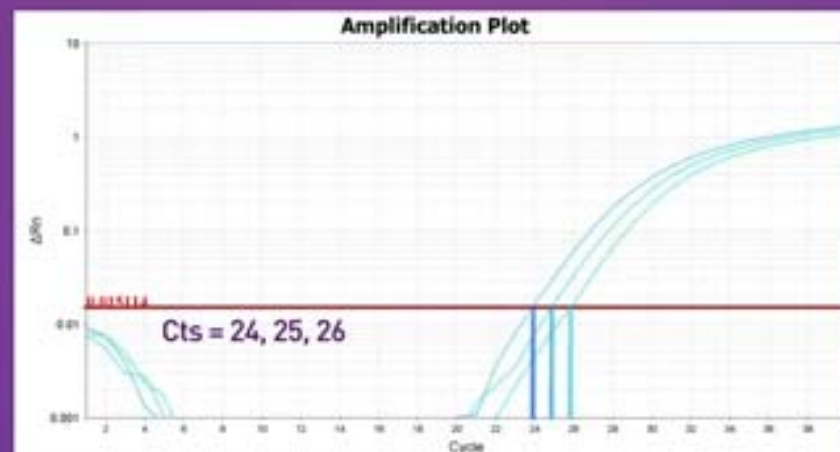
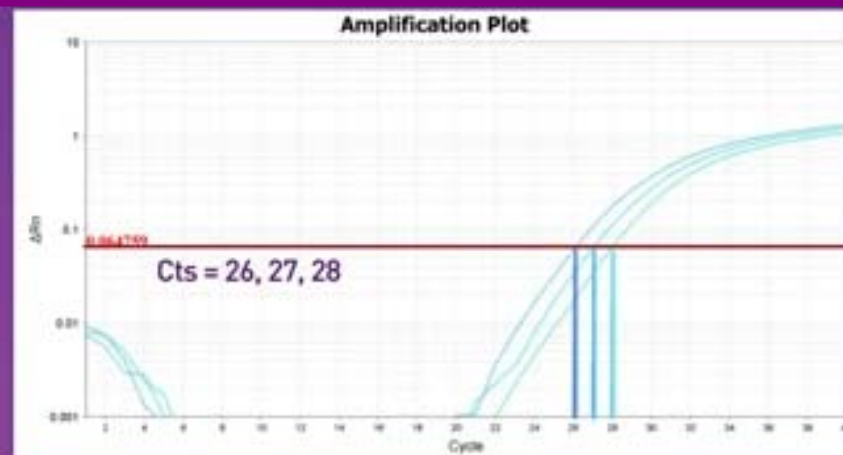
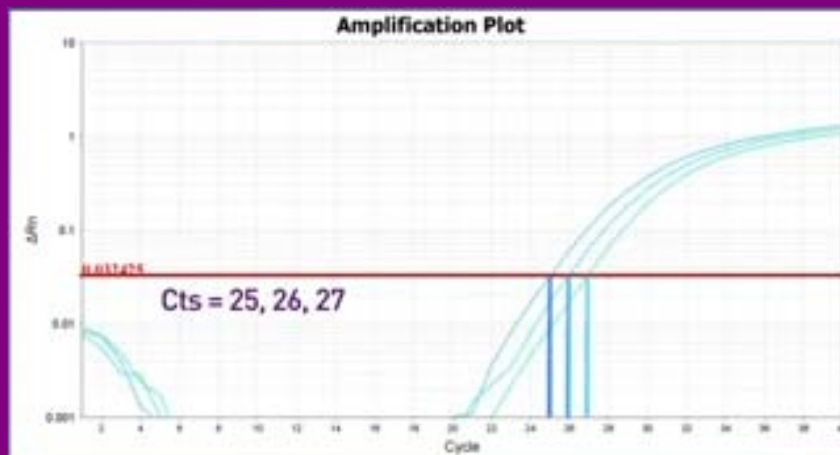
- 1) Quantità di target
- 2) Diversi reagenti
- 3) Diverse condizioni di corsa
- 4) Diversi strumenti
- 5) Efficienza della PCR



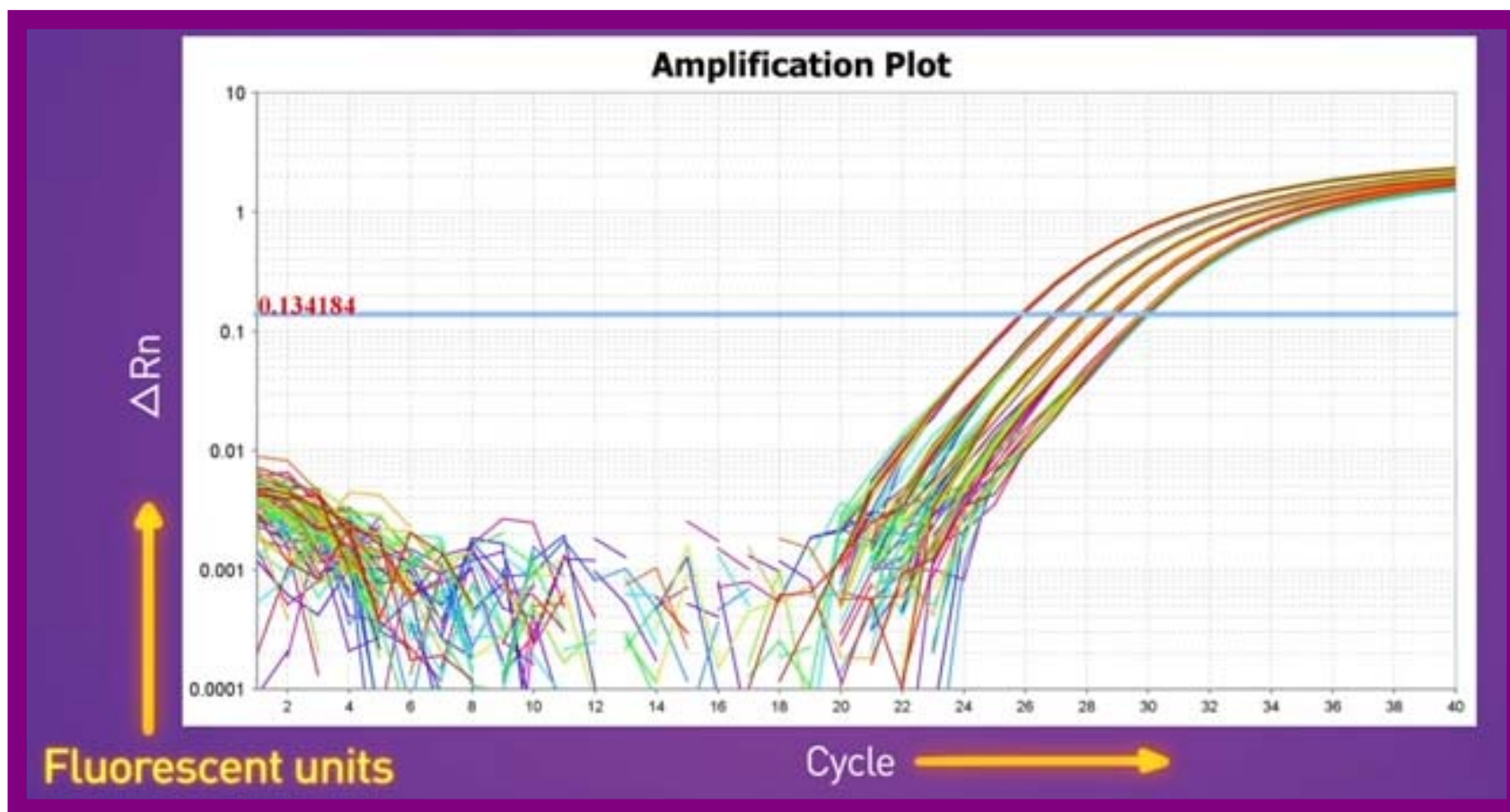


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

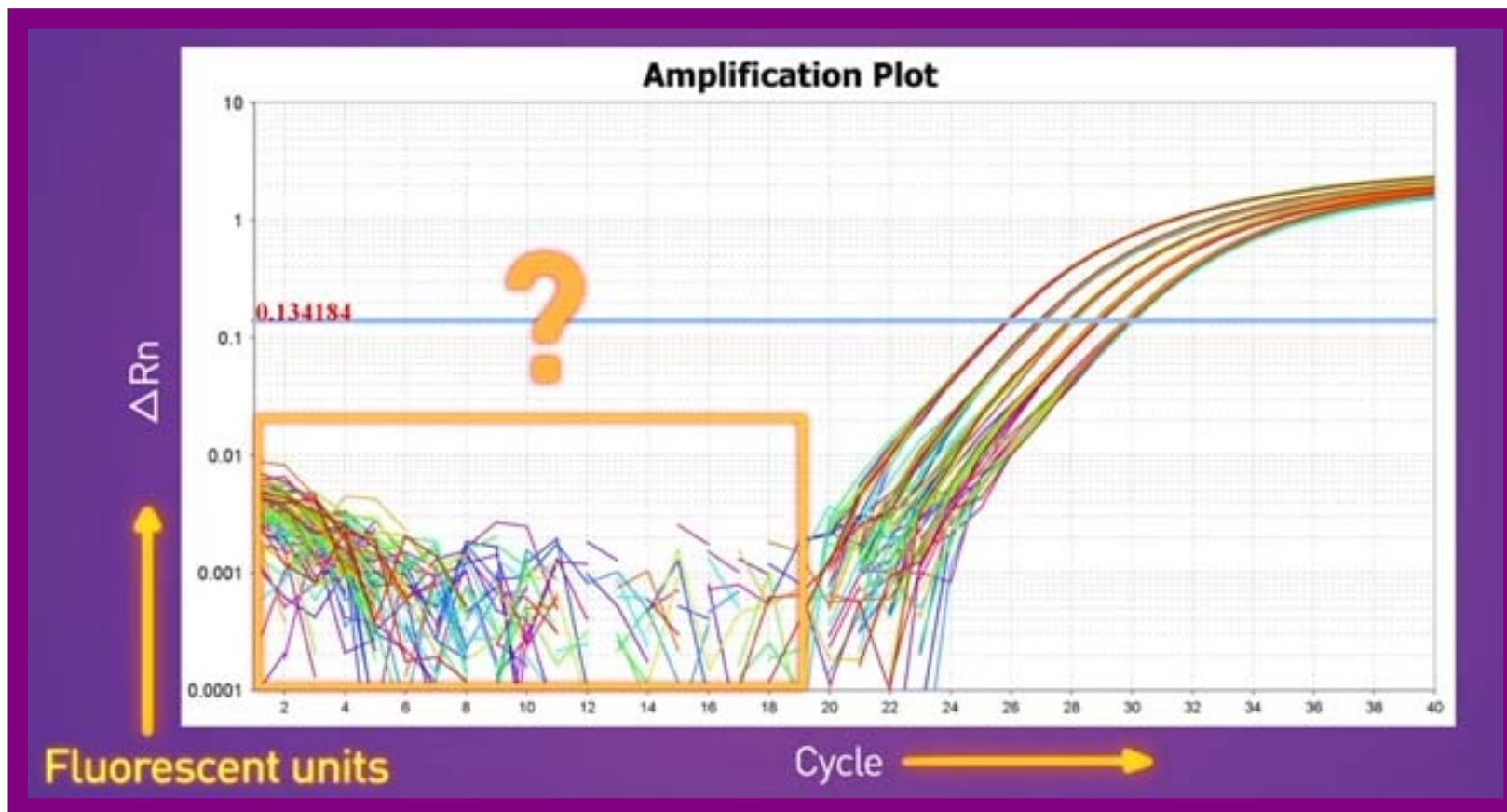
Threshold



Baseline



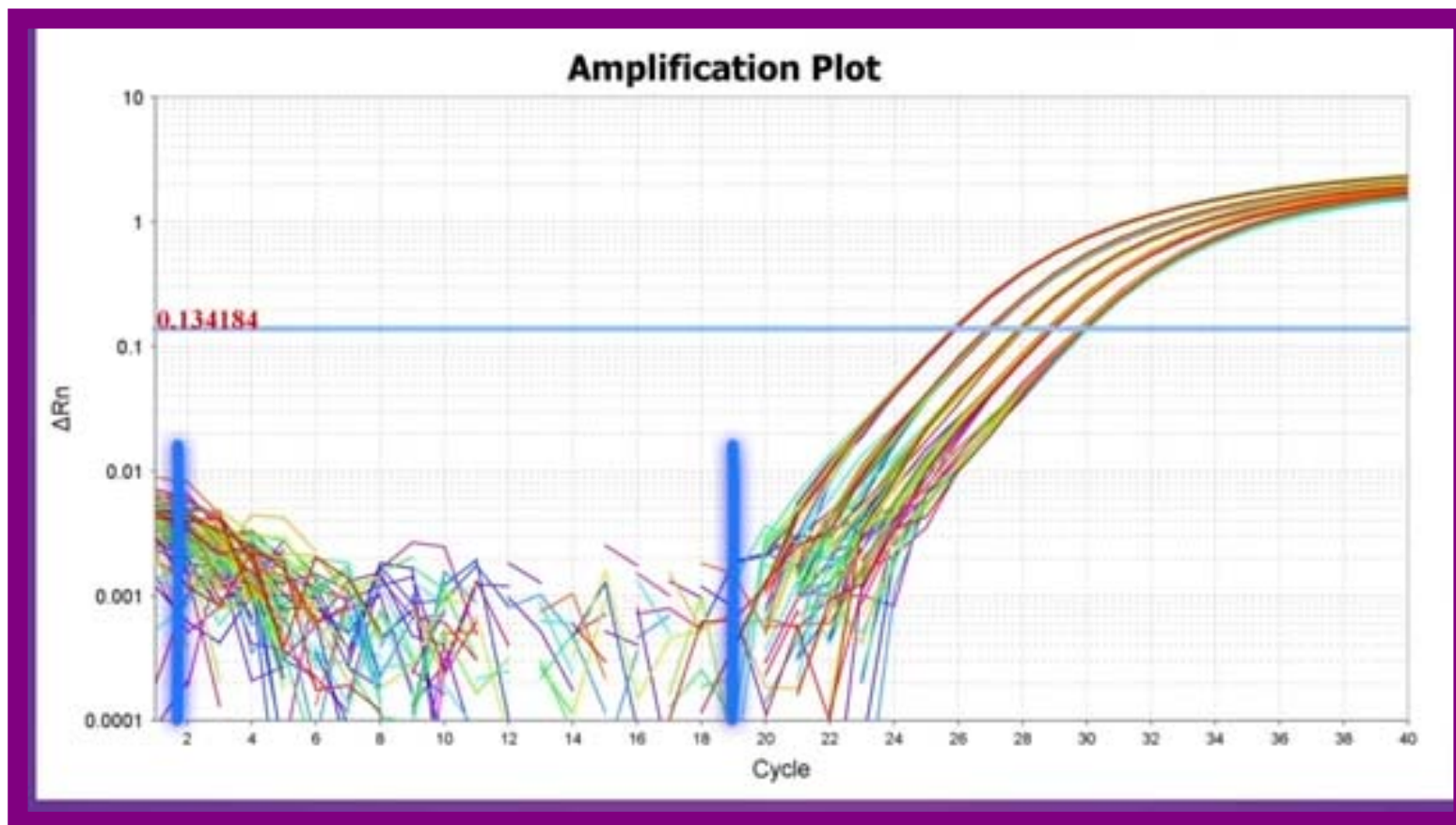
Rumore di fondo





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

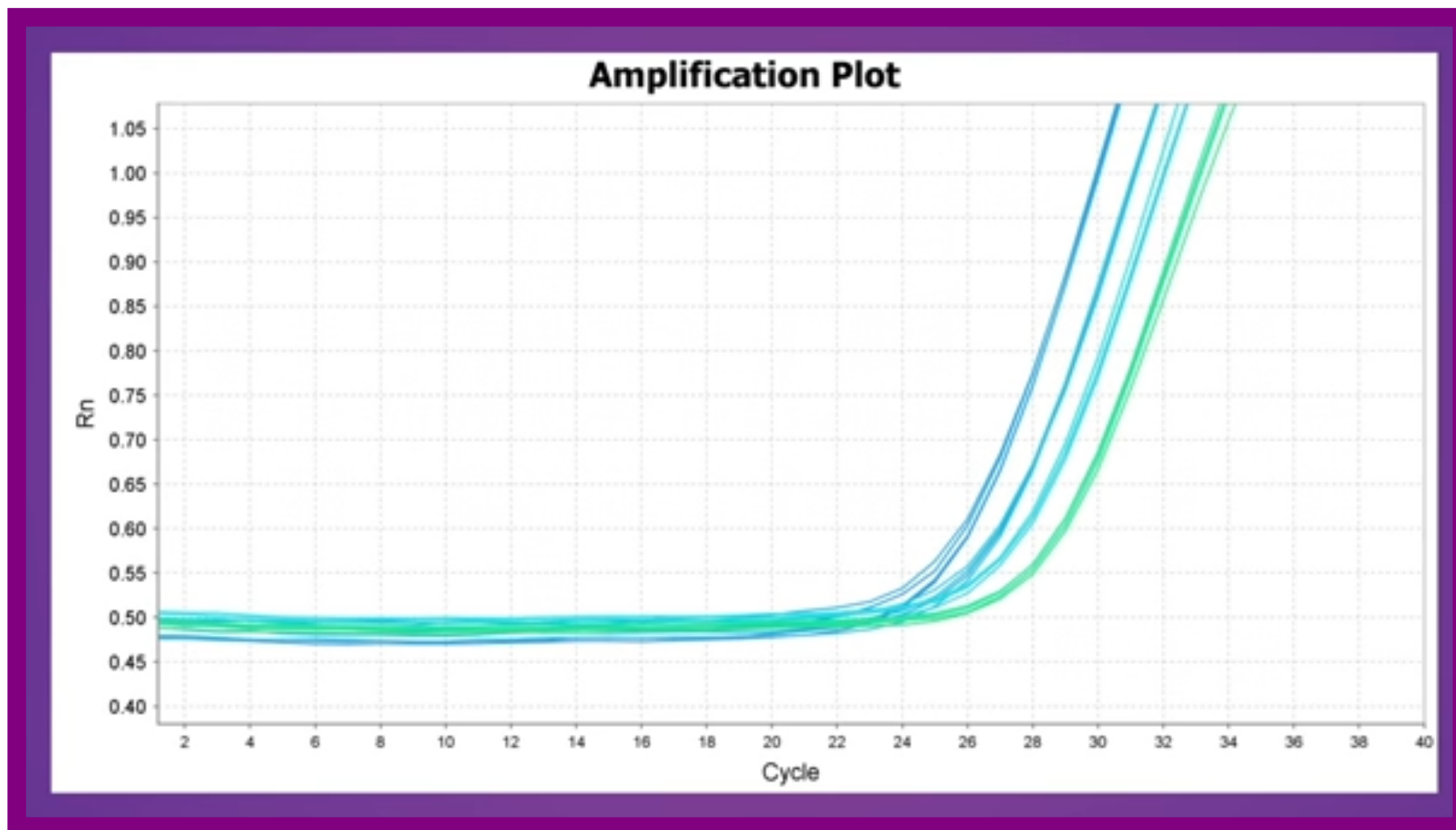
Definire la regione del rumore di fondo





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

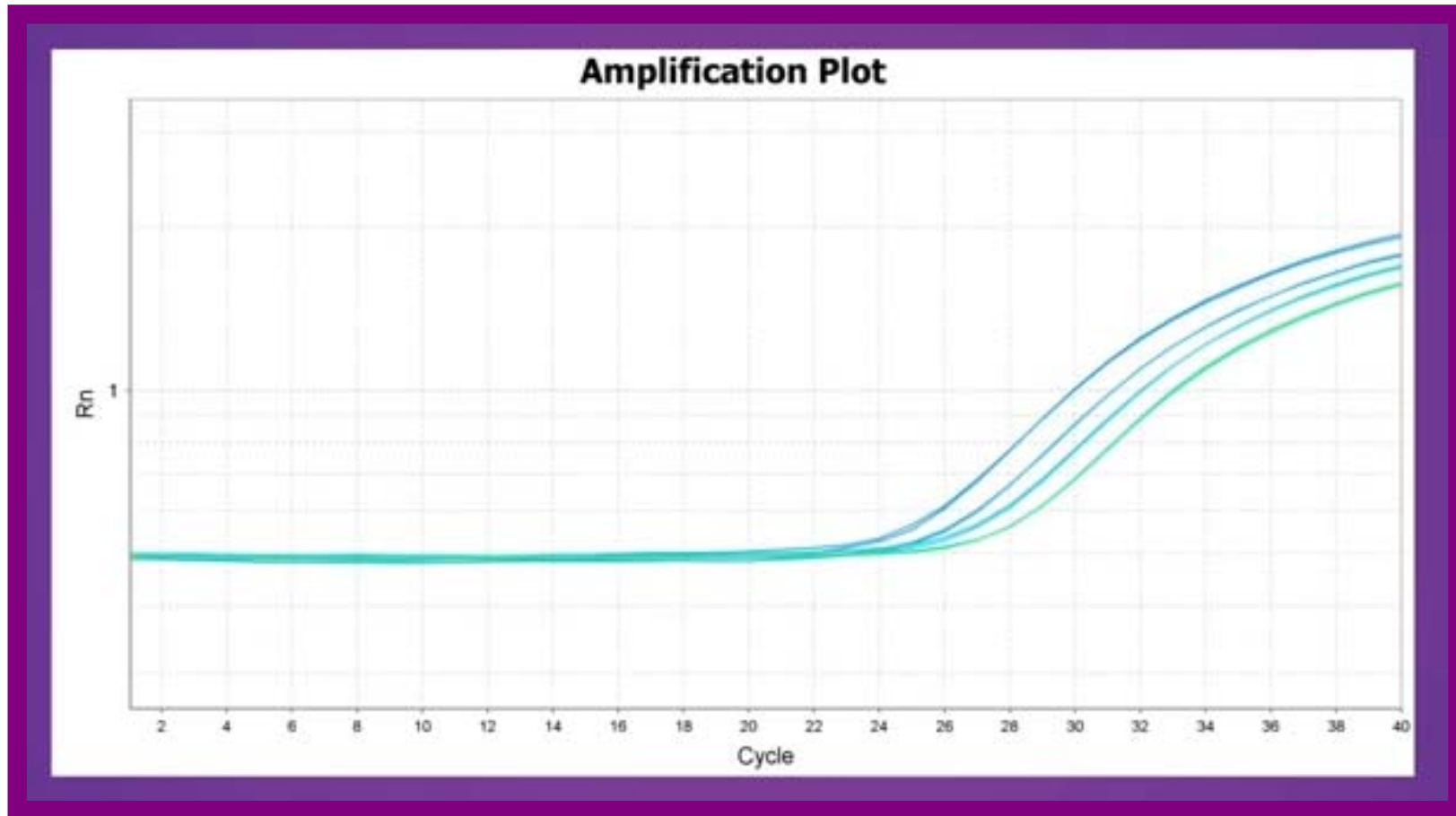
Prima della sottrazione della baseline





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

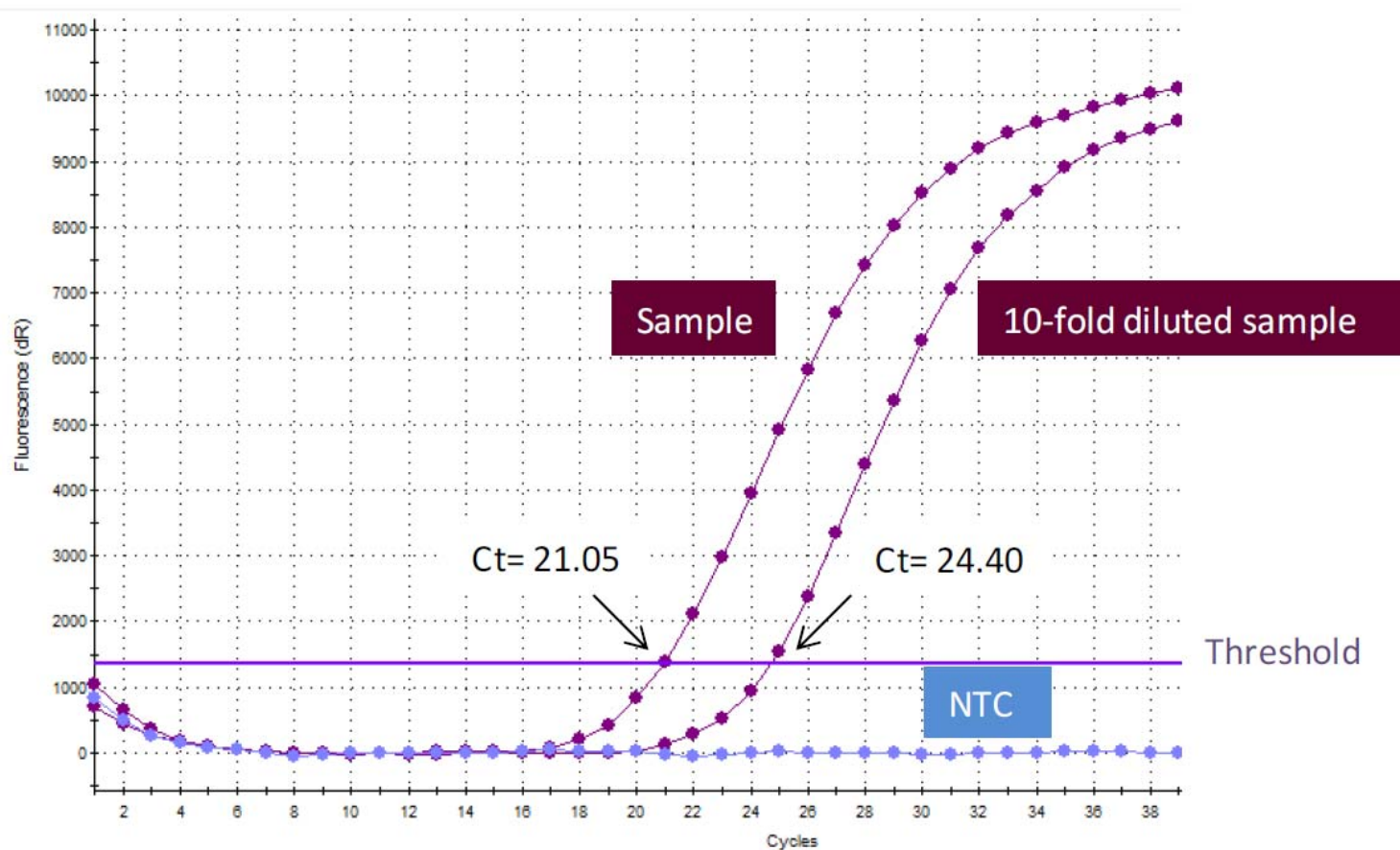
Dopo la sottrazione della baseline



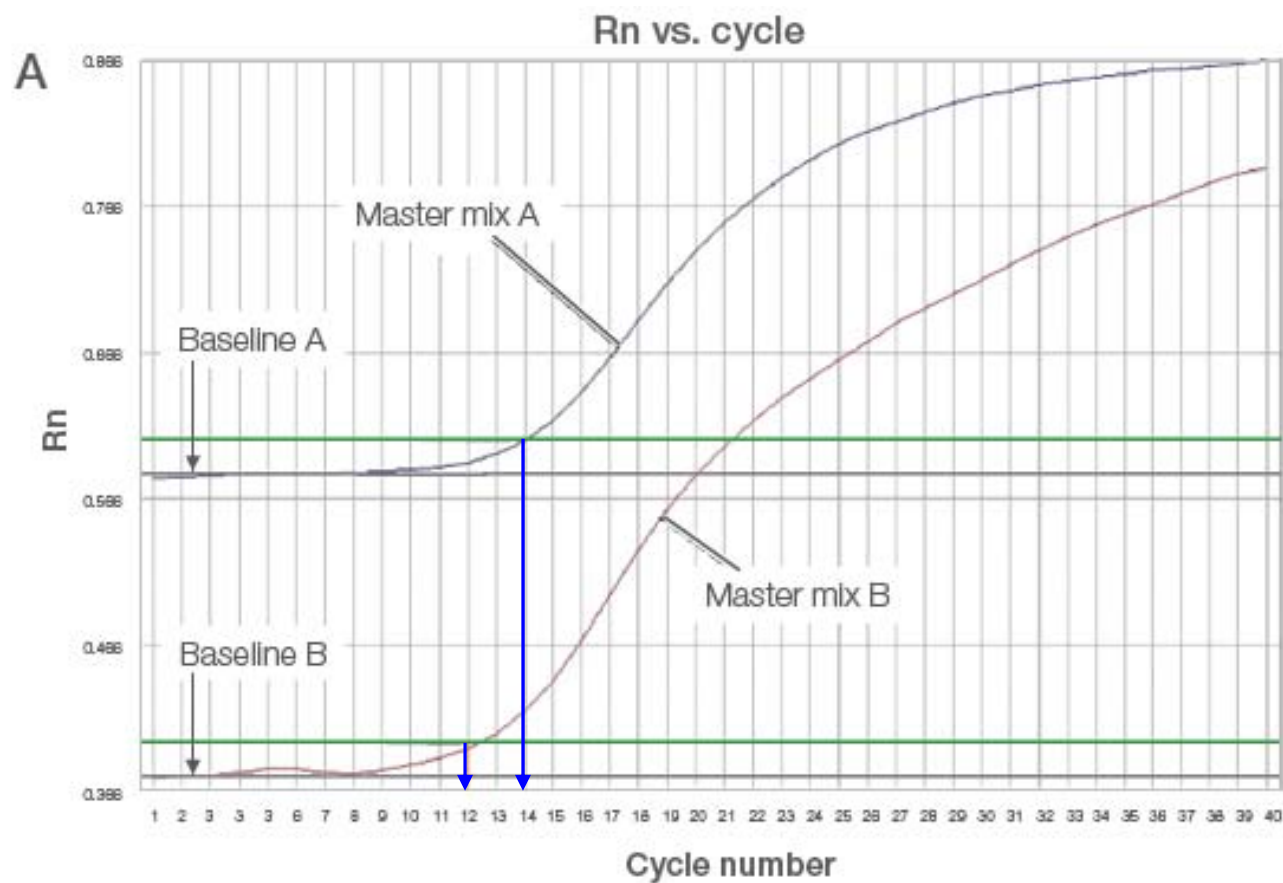


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Effetto della concentrazione del DNA



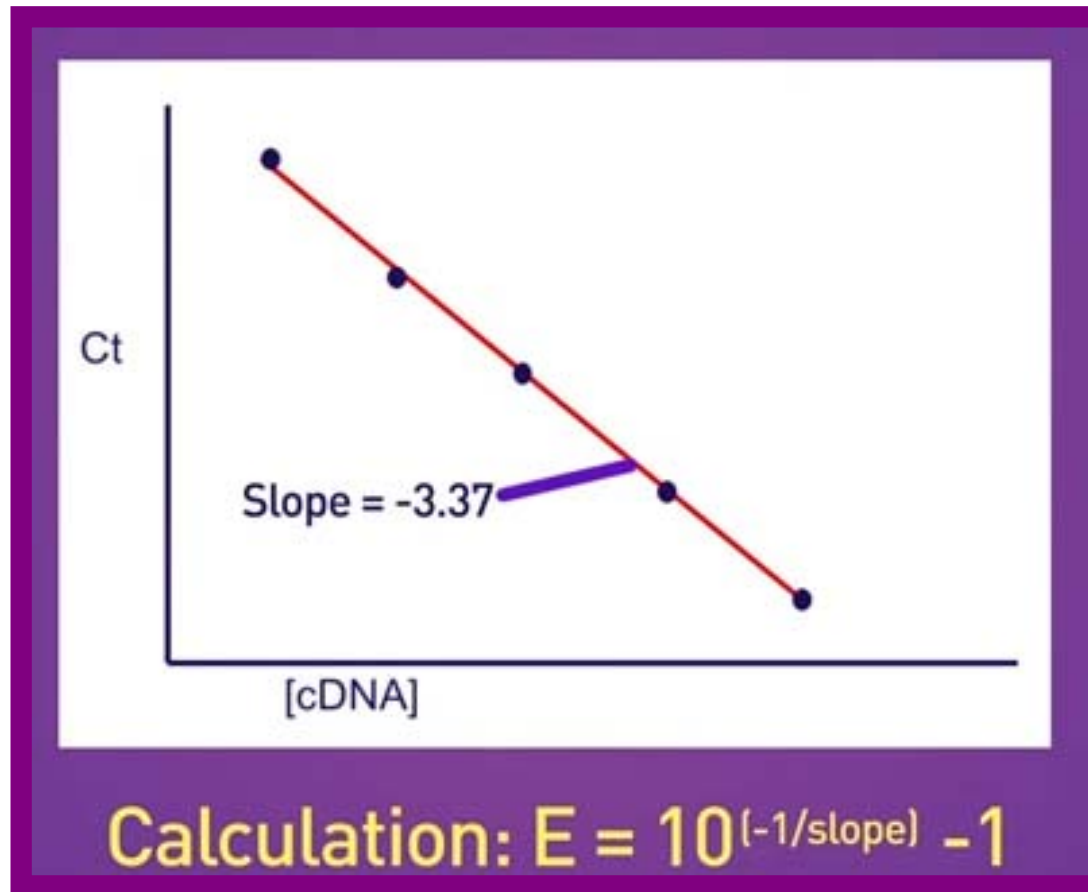
Effetto di diversi reagenti





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

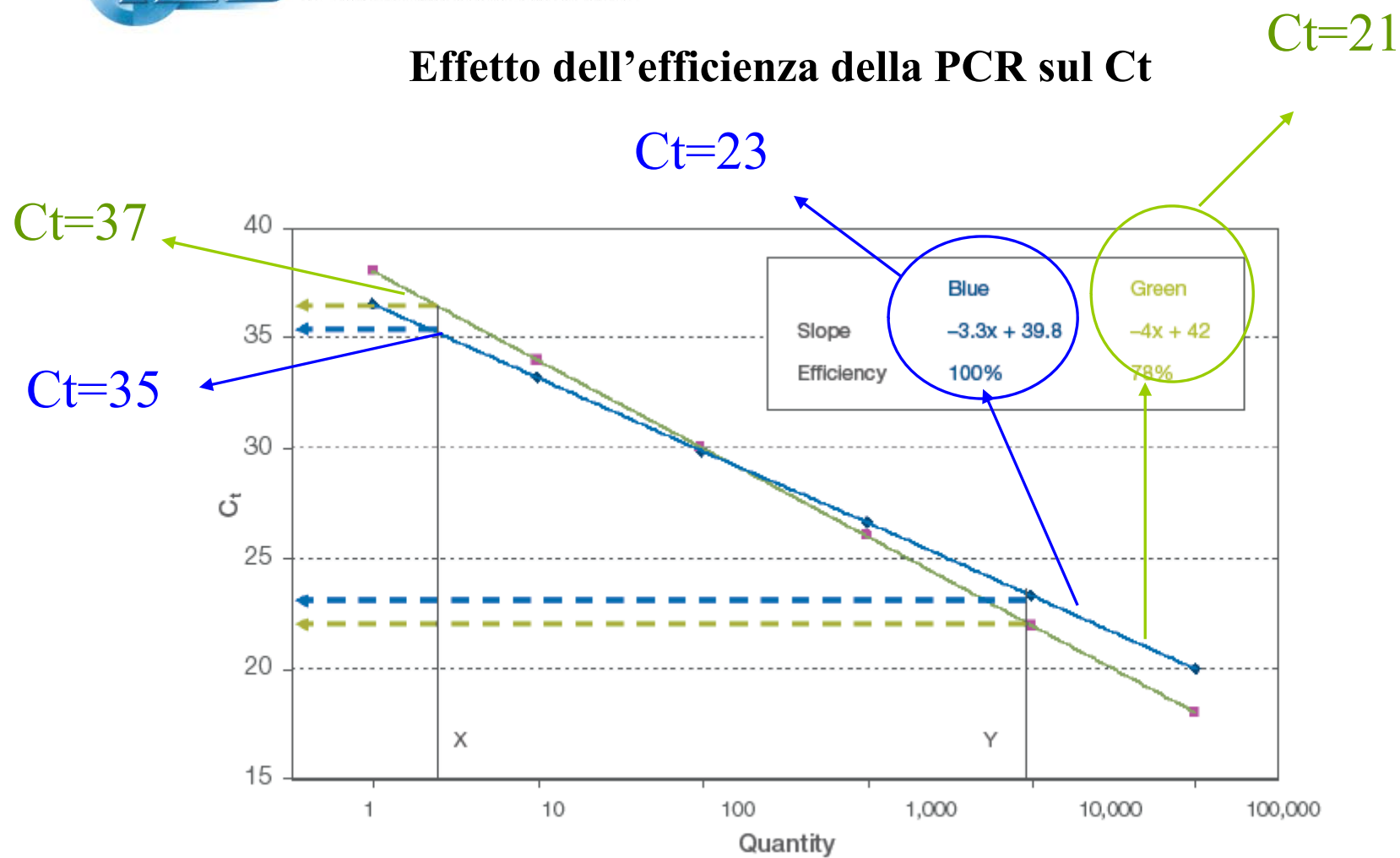
Efficienza della PCR



La valutazione della slope
della reazione fornisce una
misura dell'efficienza



Effetto dell'efficienza della PCR sul Ct



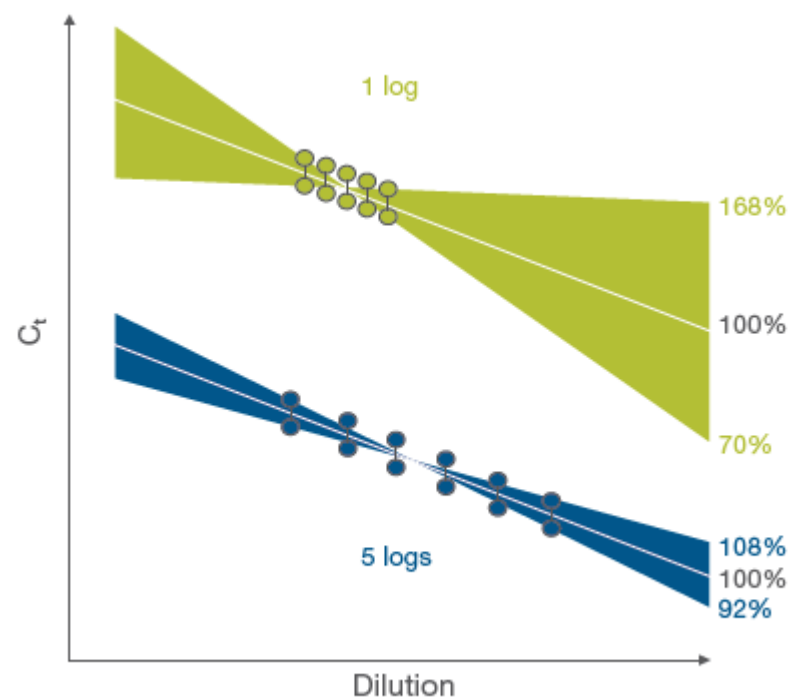


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

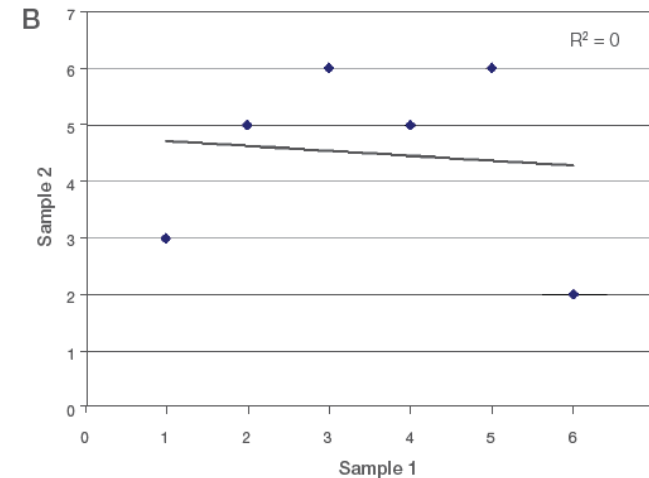
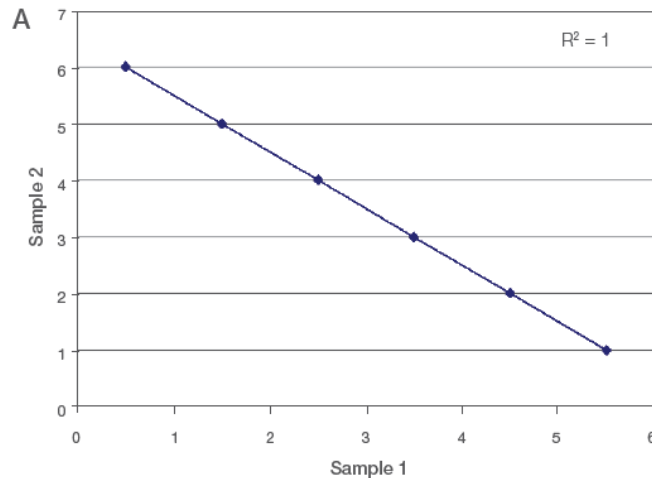
Valutazione dell'efficienza (range dinamico)

Slope

Una slope di $-3.3 \pm 10\%$ riflette
un'efficienza del $100\% \pm 10\%$.



Valore R^2



Valore R^2

Indica quanto accurata può essere la predizione di un valore sulla base di un altro valore ottenuto (Ct) = indice di buona correlazione tra segnale e analita.

$R^2 = 1$, il valore di Ct Y, può essere accuratamente usato per predire X.

$R^2 = 0$, il valore di X non può essere predetto.

$R^2 > 0.98$ buona confidenza di predizione.

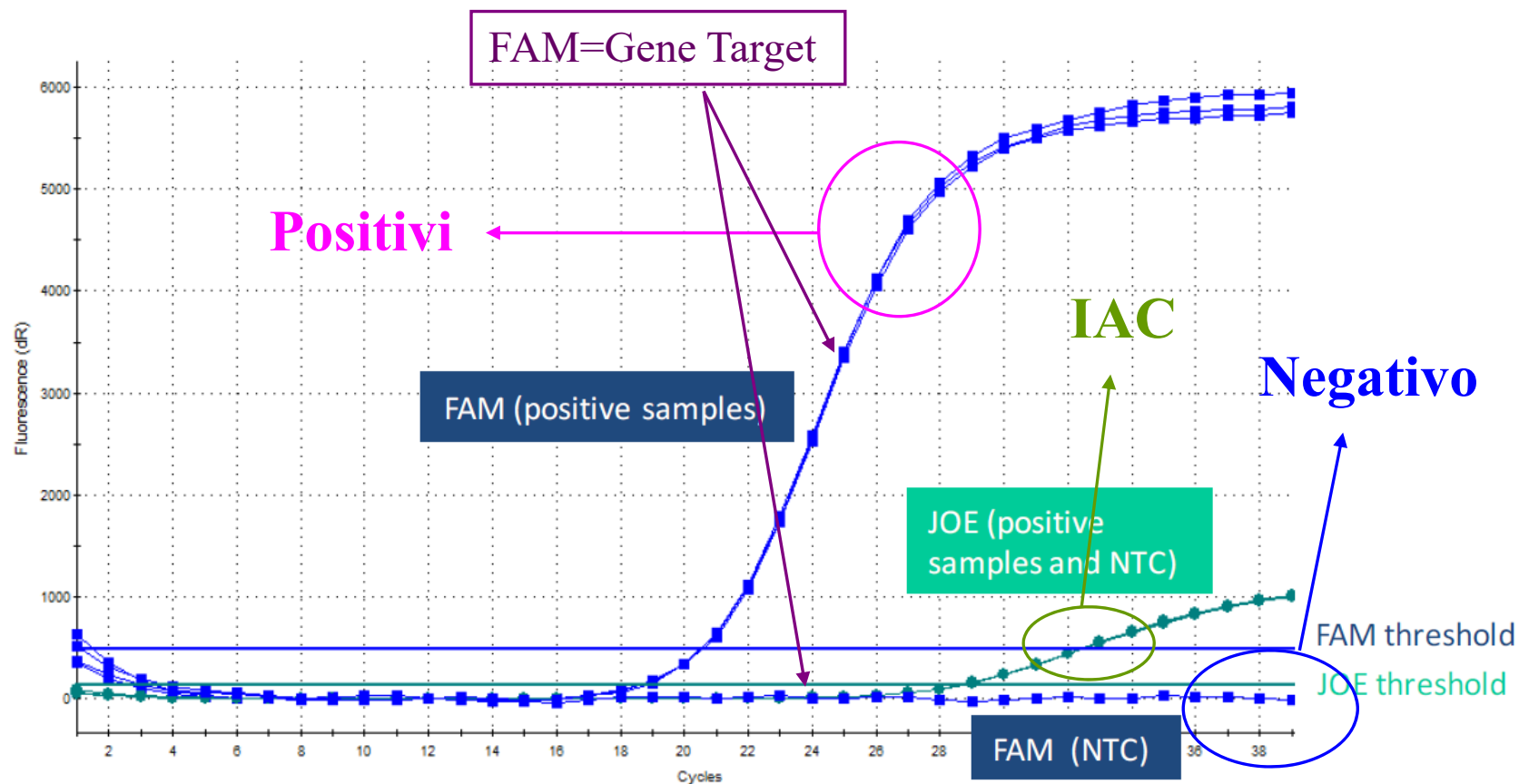


Regole d'oro per la valutazione dell'efficienza della PCR

1. Curva standard effettuata da più operatori
2. Se la curva ottenuta ha più di 2 valori outliers, o più punti sono irregolari, ripetere la curva
3. Dopo la corsa controllare il valore di R^2 ed eliminare dall'analisi gli outlier
4. Effettuare diluizioni in base 10 dello standard e analizzare almeno 5 punti
5. Saggiare ogni punto di diluizione in triplicato
6. Pipettare larghi volumi per una maggiore precisione
7. Mescolare bene i reagenti dopo la diluizione
8. Utilizzare standard certificati
9. Utilizzare il sistema delle diluizioni seriali
10. Utilizzare sempre pipette tarate

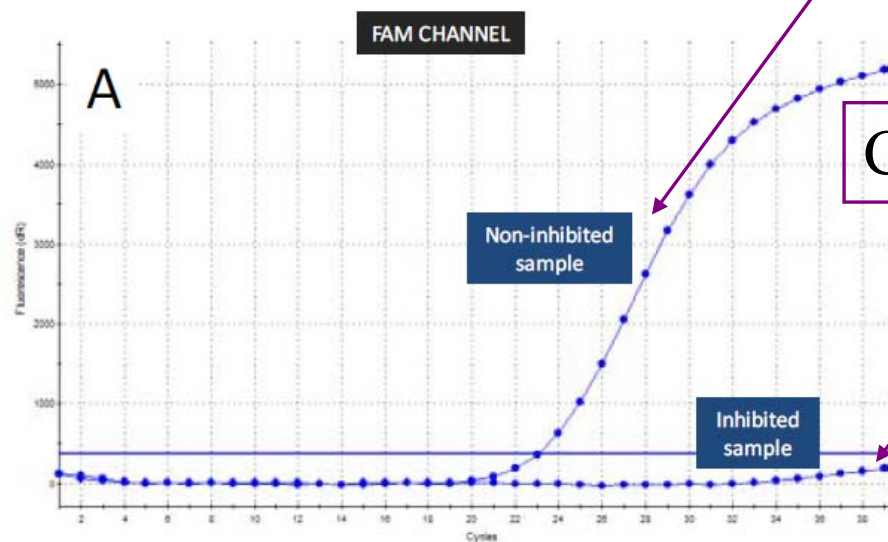


Analisi con 2 fluorofori

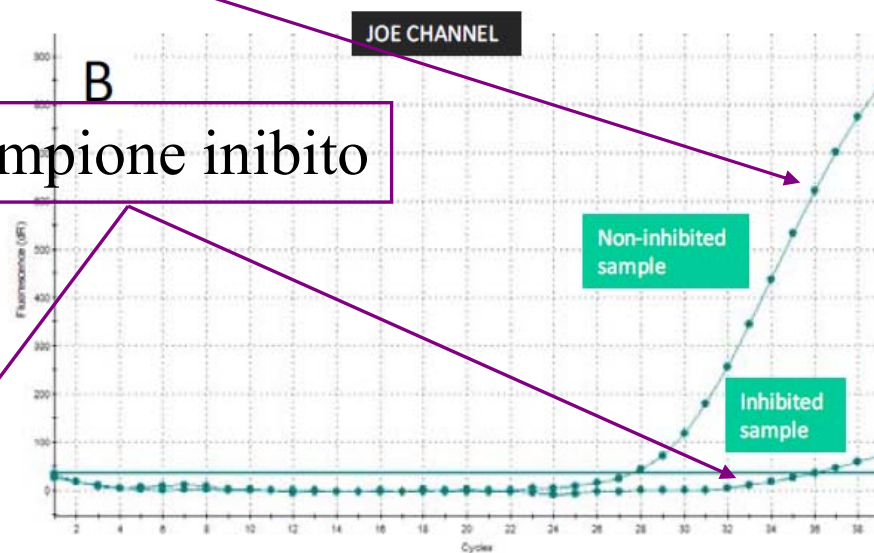


IAC = Internal Amplification Control

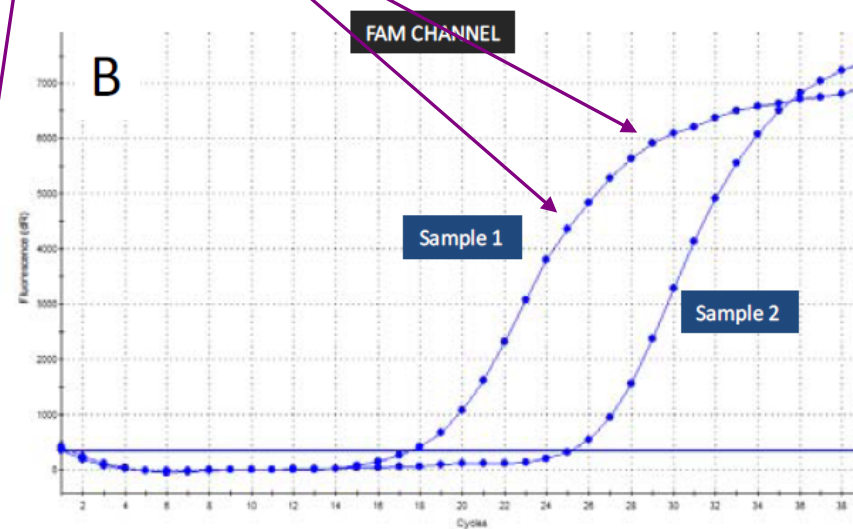
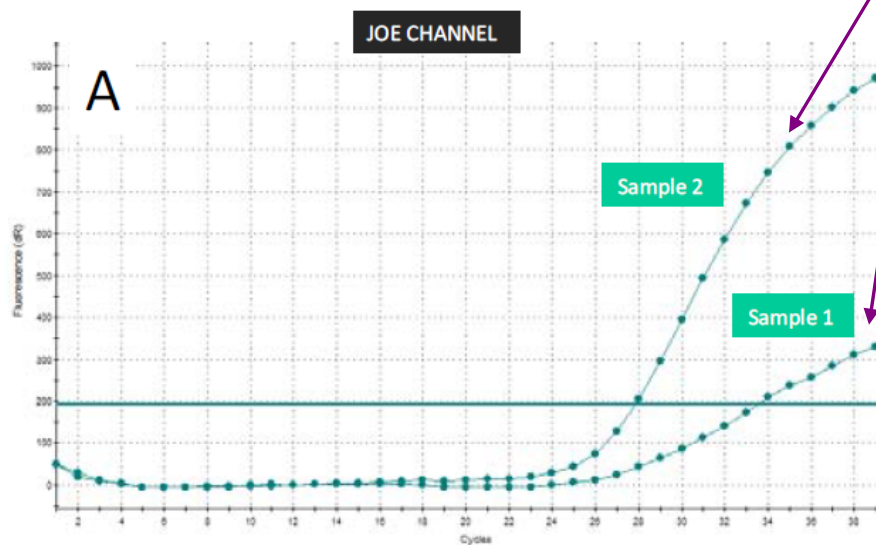
Campione non inibito



Campione inibito



Campione 1 e 2 positivi non inibiti

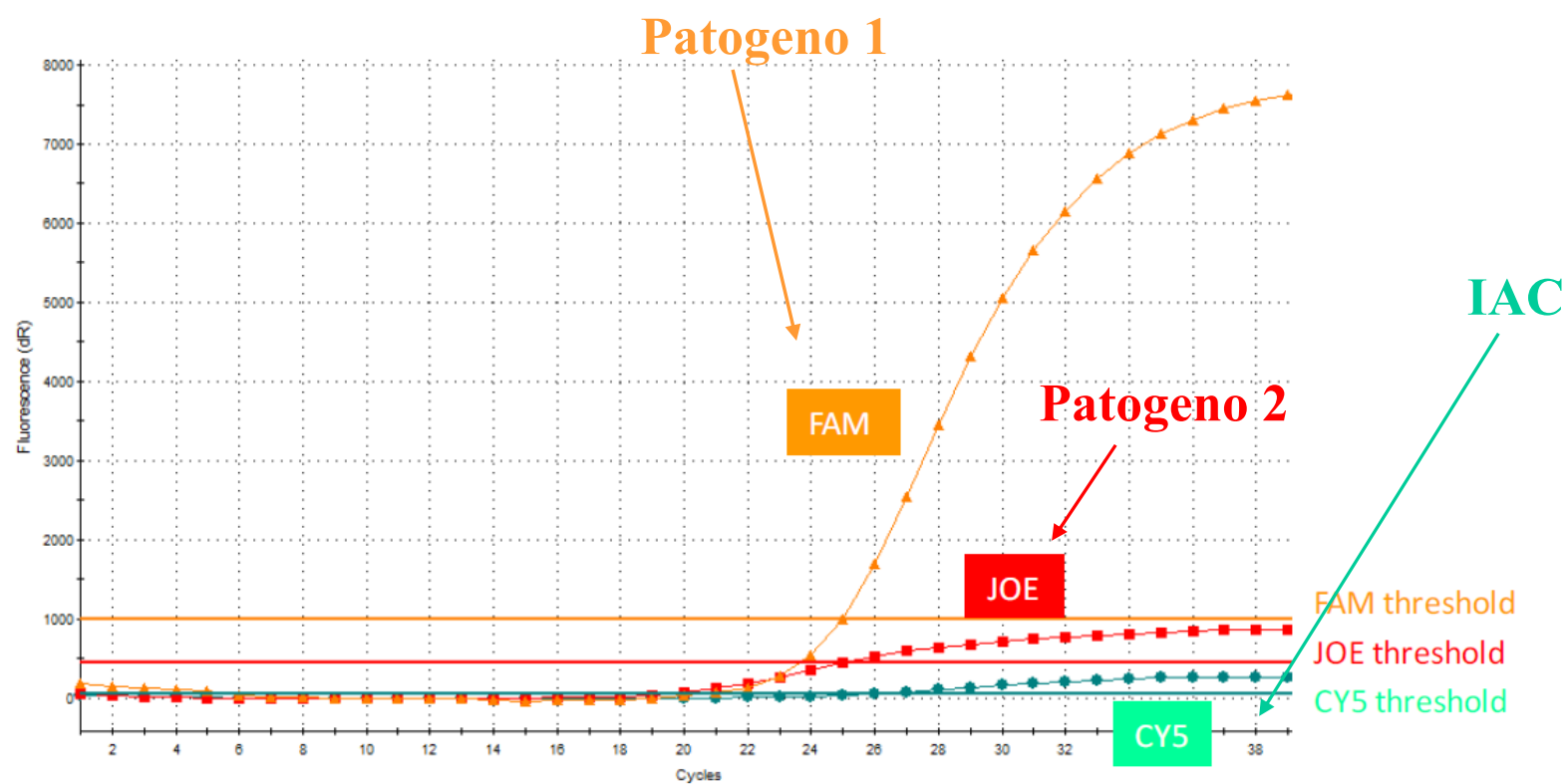


Interpretazione dei risultati con sistema di rilevazione microbica a 2 fluorofori

Fluoroforo patogeno (FAM)	Fluoroforo IAC (HEX-JOE..)	Interpretazione
Positivo	Irrilevante/positivo	Campione positivo (presenza di patogeno)
Negativo	Positivo (Ct non ritardato rispetto a NTC)	Campione negativo (assenza di patogeno)
Negativo	Negativo (Ct ritardato rispetto a NTC)	Campione inibito



Analisi con 3 fluorofori





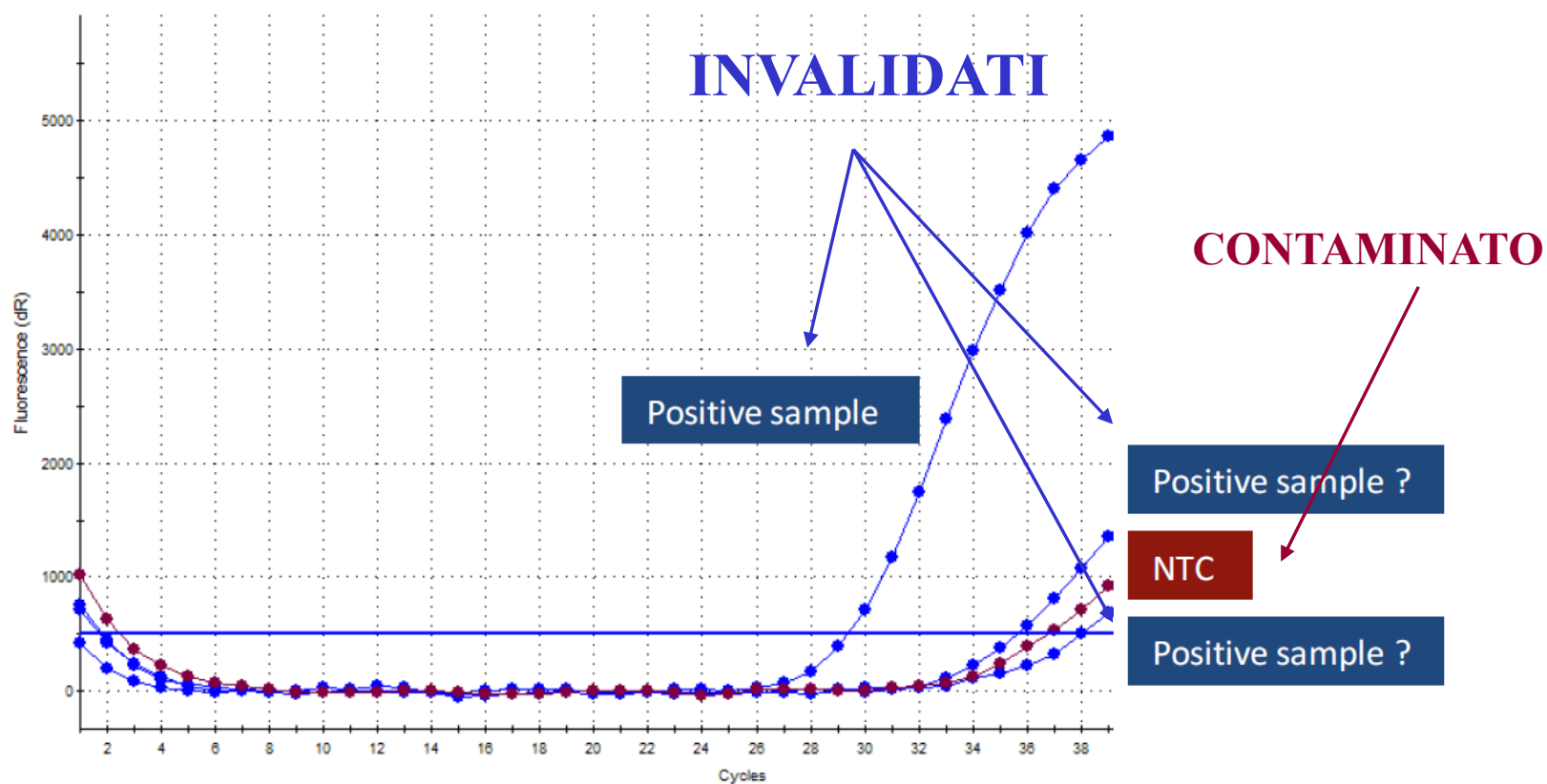
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Interpretazione dei risultati con sistema di rilevazione microbica a 3 fluorofori

Patogeno 1 (FAM)	Patogeno 2 (JOE)	IAC (CY5)	Interpretazione
Positivo	Positivo	Positivo/Irrilevante	Positivo per Patogeno 1 e 2
Positivo	Negativo	Positivo/Irrilevante	Positivo per Patogeno 1
Negativo	Positivo	Positivo/Irrilevante	Positivo per Patogeno 2
Negativo	Negativo	Positivo (Ct non ritardato rispetto a NTC)	Negativo per Patogeno 1 e 2
Negativo	Negativo	Negativo (Ct non ritardato rispetto a NTC)	Inibito

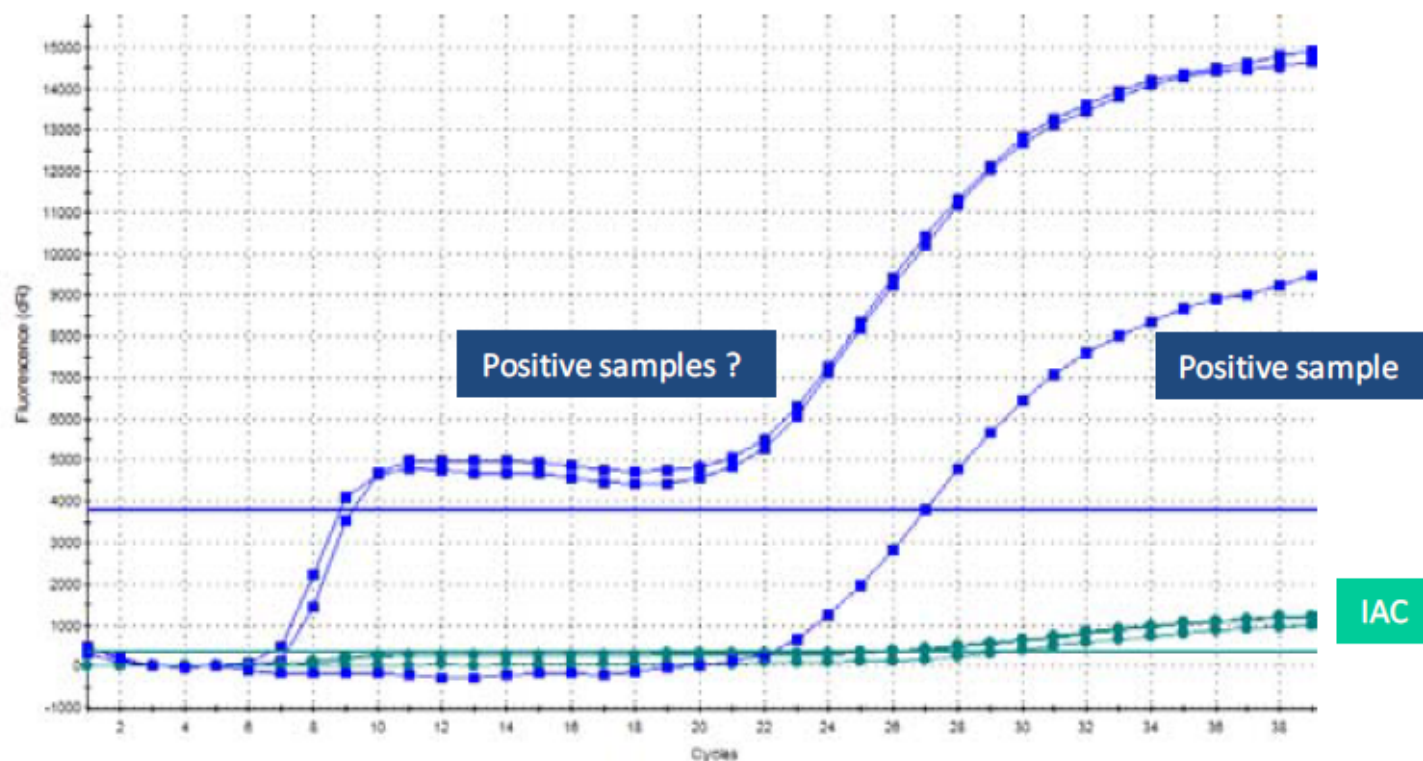


Contaminazione o alterazione della sonda



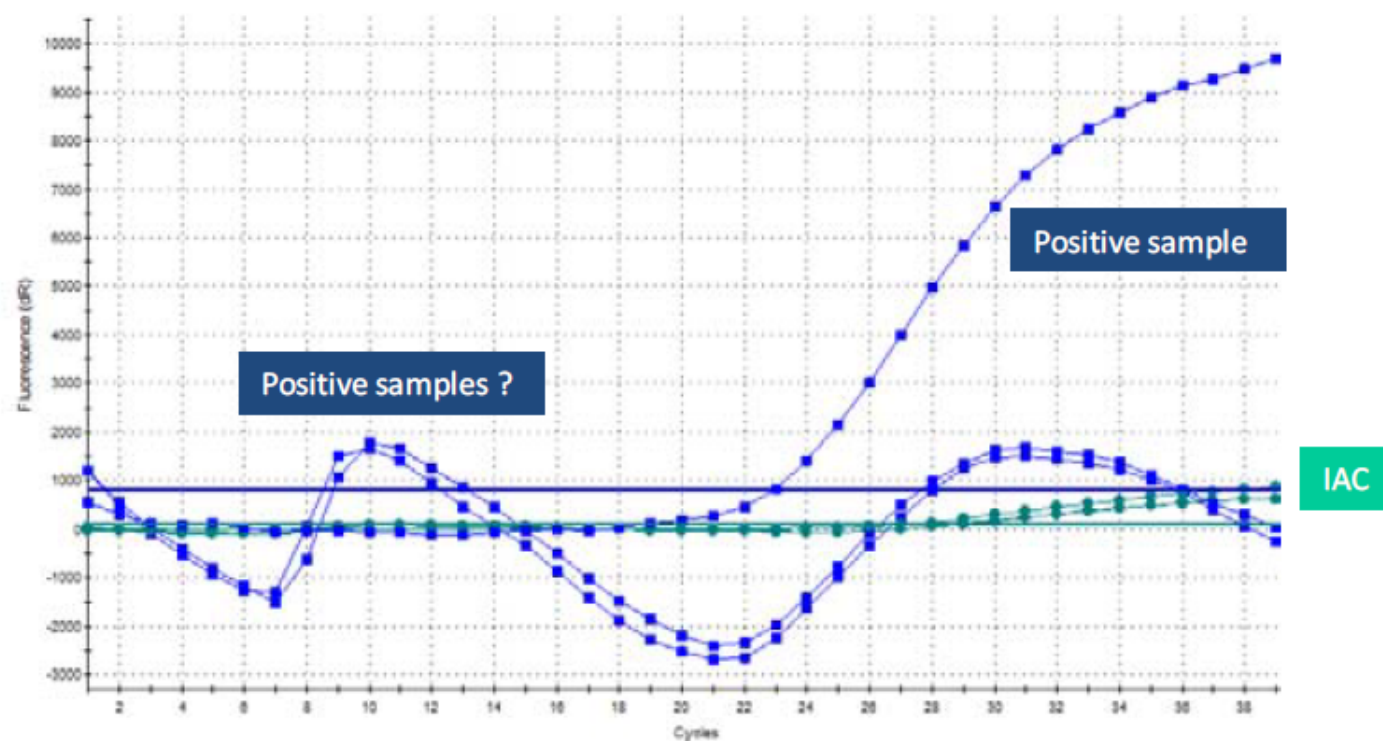
Amplificazioni anomale (1)

A



Amplificazioni anomale (2)

B





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

In caso di amplificazione
anomala di alcuni campioni,
quindi di un risultato
inconclusivo
è necessario prendere una
decisione



JAKE-CLARK.TUMBLR





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PCR Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



Cry



Sketching Science



Grazie per la vostra attenzione

**Ma veramente devo ripetere
tutti i campioni?????!!!!!!**

