



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

**Nota Tecnica n°03/2026 del LNR per i Virus di origine Alimentare:
Valutazione dell'equivalenza fra
Kit di real-time qPCR per l'uso nella ISO 15216-2:2019**

Rev. 0 del 10.07.2026

Le prove di equivalenza descritte nel presente documento sono state effettuate in conformità con la procedura POVDBM01.011 "Validazione dei metodi di prova biologia molecolare", rev. 1 del 15.07.2019.

Obiettivo:

Valutazione dell'equivalenza della performance analitica di diversi kit di real-time qPCR rispetto al kit di riferimento utilizzato nella validazione della norma ISO 15216-2:2019 (RNA UltraSense One-Step qRT-PCR System - Invitrogen).

Approccio sperimentale:

- 1) Preparazione di acidi nucleici estratti da matrici non contaminate
- 2) Tipologia di matrici testate:
 - molluschi bivalvi (mitili) [M]
 - frutti di bosco (fragole) [F]
 - tamponi (piano in acciaio) [T]
- 3) Spike degli acidi nucleici estratti da matrici con RNA-EC contenente le sequenze target per il virus dell'epatite A, norovirus GI, norovirus GII [HAV, NoVGI, NoVGII]. Poiché tali sequenze sono presenti nel medesimo frammento di RNA di sintesi, i quantitativi dei tre target sono assunti come identici. Livello di inoculo: prossimo al LOD analitico.
- 4) Spike degli acidi nucleici estratti da matrici con RNA estratto da stock di Mengovirus. Livello di inoculo: diluizione 1:100 del RNA virale negli acidi nucleici estratti da matrice.
- 5) Analisi in parallelo con i diversi kit per i target analitici HAV, NoVGI, NoVGII:
 - 6 repliche analitiche per ciascuna matrice con target analitico prossimo al LOD
 - 2 curve standard
 - 6 repliche analitiche per il controllo negativo di PCR
 - 1 reazione per la verifica dell'inibizione
- 6) Analisi in parallelo con i diversi kit per Mengovirus:
 - 6 repliche analitiche per ciascuna matrice con Mengovirus prossimo al 1%
 - 2 curve standard
 - 6 repliche analitiche per il controllo negativo di PCR



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Nota: in presenza di uno o più esiti negativi nelle determinazioni effettuate sui campioni in matrice contenenti i target al LOD (o ad una concentrazione prossima all'1% per il controllo di processo), le determinazioni sono state ripetute per confermare i risultati.

Criterio di accettabilità:

- 1) Nelle determinazioni relative ai target analitici HAV, NoVGI, NoVGII: rilevazione del target analitico in tutte le repliche
- 2) Nelle determinazioni relative al Mengovirus: rilevazione del controllo di processo $\geq 1\%$
- 3) Accettabilità dei parametri (slope, R^2) delle curve standard
- 4) Assenza di amplificazione nei controlli negativi di PCR

Sintesi delle prove:

Kit testati:

- | | |
|--|---------------------|
| a) RNA UltraSense One-Step qRT-PCR System – Invitrogen, cod. 11732927 | [UltraSense] |
| b) TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix – AppliedBiosystems, cod. 4444432 | [FastVirus] |
| c) VetMAX-Plus Multiplex One-step RT-PCR kit – AppliedBiosystems, cod. 4415330 | [VetMAX] |

Condizioni di PCR:

- a) RNA UltraSense One-Step qRT-PCR System – Invitrogen, cod. 11732927

Concentrazione di primers e probe: come da ISO 15216-2:2019

Volume di reazione finale: 25 microL (20 microL mix + 5 microL campione)

Profilo termico: 55°C per 60 min + 95°C per 5 min + 45 cicli (95°C per 15 s + 60°C per 60 s + 65°C per 60 s)

Durata corsa: 3h 15min

- b) TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix – AppliedBiosystems, cod. 4444432

Concentrazione di primers e probe: come da ISO 15216-2:2019

Volume di reazione finale: 20 microL (15 microL mix + 5 microL campione)

Profilo termico: 50°C per 15 min + 95°C per 20 s + 45 cicli (95°C per 5 s + 60°C per 30 s)

Durata corsa: 1h 10min

- c) VetMAX-Plus Multiplex One-step RT-PCR kit – AppliedBiosystems, cod. 4415330

Concentrazione di primers e probe: come da ISO 15216-2:2019

Volume di reazione finale: 25 microL (20 microL mix + 5 microL campione)

Profilo termico: 50°C per 20 min + 95°C per 10 min + 45 cicli (95°C per 15 s + 60°C per 45 s)

Durata corsa: 1h 40min

Piattaforma di real-time PCR utilizzata:

QuantStudio 12K (Applied Biosystems, s.n. 285881275)

Periodo di esecuzione delle prove:

15.06.2026 – 19.06.2026



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Valori di inoculo verificati:

Per la verifica dei livelli di inoculo utilizzati, per ciascuna delle tre matrici (M, F, T) le 6 repliche analitiche sono state valutate utilizzando come riferimento i valori ottenuti nella determinazione effettuata con il kit di riferimento (RNA UltraSense One-Step qRT-PCR System – Invitrogen) attraverso la curva std 1. Poiché le sequenze di HAV, NoVGI e NoVGII sono presenti nel medesimo frammento di RNA di sintesi e i quantitativi dei tre target sono assunti come identici, i valori ottenuti nelle tre diverse determinazioni sono stati mediati.

Livello di inoculo di HAV, NoVGI, NoVGII in M = 1.95 ± 0.97 c.g./microL di acido nucleico del campione

Livello di inoculo di HAV, NoVGI, NoVGII in F = 2.28 ± 1.16 c.g./microL di acido nucleico del campione

Livello di inoculo di HAV, NoVGI, NoVGII in T = 1.85 ± 1.16 c.g./microL di acido nucleico del campione

Livello di inoculo di Mengovirus in M = 2.77 ± 0.17 %

Livello di inoculo di Mengovirus in F = 2.77 ± 0.15 %

Livello di inoculo di Mengovirus in T = 2.90 ± 0.27 %

I valori di inibizione negativi sono stati considerati pari a zero.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Risultati:

NoVGI

	UltraSense			FastVirus			VetMAX		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
Rilevazione target al LOD	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Cq medio	36.13	35.95	36.66	36.01	36.25	36.02	36.63	36.03	36.57
SD Cq	0.60	1.01	1.40	0.76	0.54	0.50	0.56	0.71	1.26
Cq min	35.44	34.83	34.89	34.91	35.46	35.36	35.88	35.08	35.39
Cq max	37.22	37.75	38.29	36.80	37.14	36.74	37.46	36.98	38.67
Inibizione (ΔCq)	0	0	0	0	0.07	0.24	0.03	0	0.12
Negativi di PCR	6/6			6/6			6/6		
Curva stnd 1									
Slope	-3.573			-3.511			-3.487		
R2	0.999			0.999			0.998		
N° outliers	2			0			0		
Curva stnd 2									
Slope	-3.449			-3.595			-3.601		
R2	0.999			0.999			1.000		
N° outliers	0			1			2		



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

NoVGII

	UltraSense			FastVirus			VetMAX		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
Rilevazione target al LOD	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Cq medio	34.60	34.94	34.92	34.60	37.74	33.72	35.55	35.31	35.30
SD Cq	0.50	0.94	0.58	0.51	1.01	0.47	0.36	0.50	0.55
Cq min	34.24	34.23	33.86	34.20	36.68	32.96	35.05	34.59	34.68
Cq max	35.58	36.17	35.57	35.57	39.06	34.39	35.97	35.95	36.24
Inibizione (ΔCq)	0	0	0.05	0.10	0.11	0.24	0	0.23	0.14
Negativi di PCR	6/6			6/6			6/6		
Curva stnd 1									
Slope	-3.553			-3.550			-3.552		
R2	0.999			0.999			1.000		
N° outliers	1			2			1		
Curva stnd 2									
Slope	-3.490			-3.423			-3.434		
R2	0.999			0.998			0.996		
N° outliers	0			0			1		



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

HAV

	UltraSense			FastVirus			VetMAX		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
Rilevazione target al LOD	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6 *	6/6	6/6	6/6	6/6
Cq medio	36.99	36.04	36.63	35.17	36.66	35.96	36.90	36.52	37.48
SD Cq	0.92	0.86	0.94	0.31	0.61	0.95	1.22	1.14	1.00
Cq min	35.89	34.70	35.27	34.73	35.71	34.46	35.02	34.87	36.16
Cq max	38.43	36.88	37.69	35.52	37.38	37.08	38.15	37.80	38.83
Inibizione (ΔCq)	0	0	0	0.70	0.31	0.25	0	0.10	0.27
Negativi di PCR	6/6			6/6			6/6		
Curva std 1									
Slope	-3.489			-3.478			-3.431		
R2	0.999			0.999			0.999		
N° outliers	0			0			0		
Curva std 2									
Slope	-3.500			-3.339			-3.464		
R2	0.999			0.999			0.999		
N° outliers	1			1			1		

* esito confermato in due corse indipendenti



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Mengovirus

	UltraSense			FastVirus			VetMAX		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
Rilevazione >1%	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
Recupero % medio	2.76	2.77	2.86	1.93	1.61	1.71	1.70	1.83	1.45
SD Recupero %	0.17	0.15	0.23	0.13	0.06	0.04	0.23	0.19	0.10
Recupero % min	2.58	2.51	2.70	1.78	1.53	1.67	1.29	1.54	1.37
Recupero % max	3.07	2.97	3.20	2.13	1.71	1.76	2.01	2.04	1.60
Negativi di PCR	6/6			6/6			6/6		
Curva std 1									
Slope	-3.459			-3.429			-3.349		
R2	0.999			0.998			1.000		
N° outliers	1			1			1		
Curva std 2									
Slope	-3.426			-3.290			-3.125		
R2	0.999			1.000			1.000		
N° outliers	1			1			1		



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Discussione dei risultati

Le prove di equivalenza effettuate hanno evidenziato quanto segue:

- a) Relativamente alle analisi per la determinazione dei target HAV, NoVGI, NoVGII il sistema TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix – AppliedBiosystems, cod. 4444432 non ha fornito risultati interamente equivalenti al sistema RNA UltraSense One-Step qRT-PCR System – Invitrogen, cod. 11732927. Nella combinazione matrice = frutti di bosco / target = HAV il kit ha infatti determinato correttamente la presenza del virus in sole 5 delle 6 repliche.
Inoltre, nella combinazione matrice = frutti di bosco / target = NoVGII, pur rilevando la presenza del virus in tutte le repliche, il kit ha ottenuto valori di Cq significativamente superiori rispetto al sistema di riferimento (37.74 ± 1.01 vs. 34.94 ± 0.94). Tale risultato è probabilmente riconducibile a una suscettibilità di tale kit rispetto ad un'interferenza della matrice con la reazione di amplificazione di NoVGII, che determina una precoce riduzione della fluorescenza emessa nel corso dell'amplificazione (Fig.12).
Significativamente, in altre combinazioni matrice/target, il kit ha di contro fornito esiti con valori di Cq significativamente inferiori rispetto al sistema di riferimento (es. molluschi / HAV: 35.17 ± 0.31 vs. 36.99 ± 0.92 ; tamponi / NoVGII: 33.72 ± 0.47 vs. 34.92 ± 0.58).
- b) Relativamente alle analisi per la determinazione dei target HAV, NoVGI, NoVGII il sistema VetMAX-Plus Multiplex One-step RT-PCR kit – AppliedBiosystems, cod. 4415330 ha fornito risultati equivalenti al sistema RNA UltraSense One-Step qRT-PCR System – Invitrogen, cod. 11732927.
Tuttavia, si evidenzia che tale kit, nelle combinazioni matrice = mollusco / target = NoVGII e matrice = tamponi / target = HAV, ha prodotto valori di Cq superiori rispetto al kit di riferimento (35.55 ± 0.36 vs. 34.60 ± 0.50 e 37.48 ± 1.00 vs. 36.63 ± 0.94 , rispettivamente).
- c) Relativamente alle determinazioni del virus controllo di processo (Mengovirus), entrambe i sistemi alternativi hanno correttamente determinato il quantitativo del virus controllo di processo come superiore all'1%. Si evidenzia tuttavia come, per tutte le combinazioni matrice/target, le stime di recupero prodotte dai kit alternativi siano inferiori rispetto a quelle del kit di riferimento.

Roma, xx.xx.2026

Il Responsabile

dott.ssa Elisabetta Suffredini

Responsabili dell'esecuzione delle prove:

dott.ssa Arianna Boni

dott.ssa Simona Di Pasquale

dott.ssa Teresa Vicenza



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Appendice: Curve di amplificazione ottenute nelle prove di equivalenza

Kit UltraSense

Fig.1: NoVGI – curva stnd

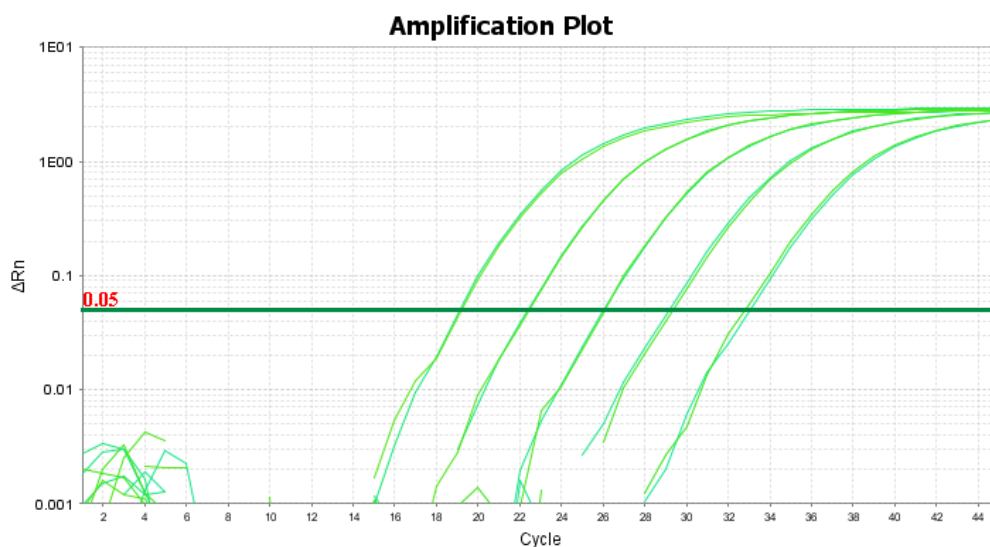
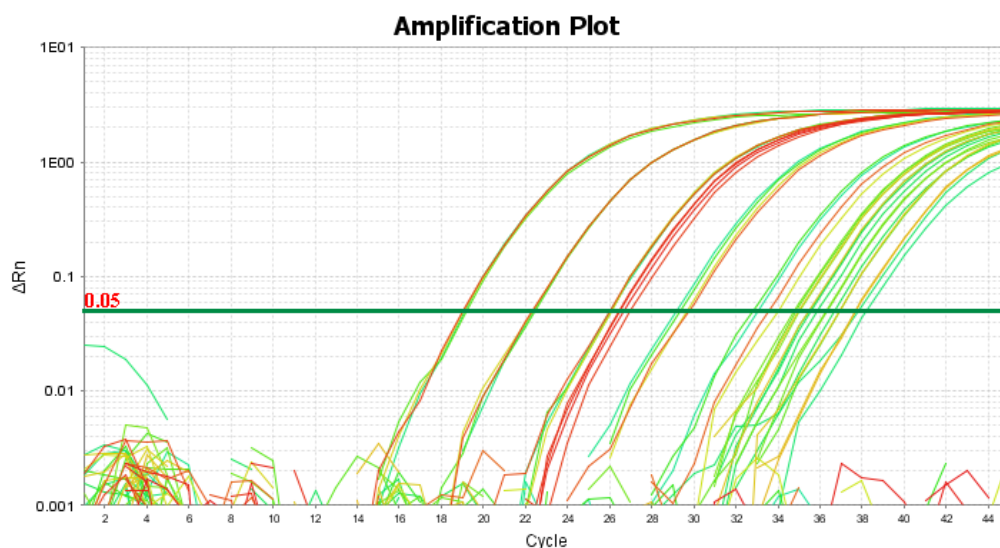


Fig.2: NoVGI – stnd e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.3: NoVGII – curva std

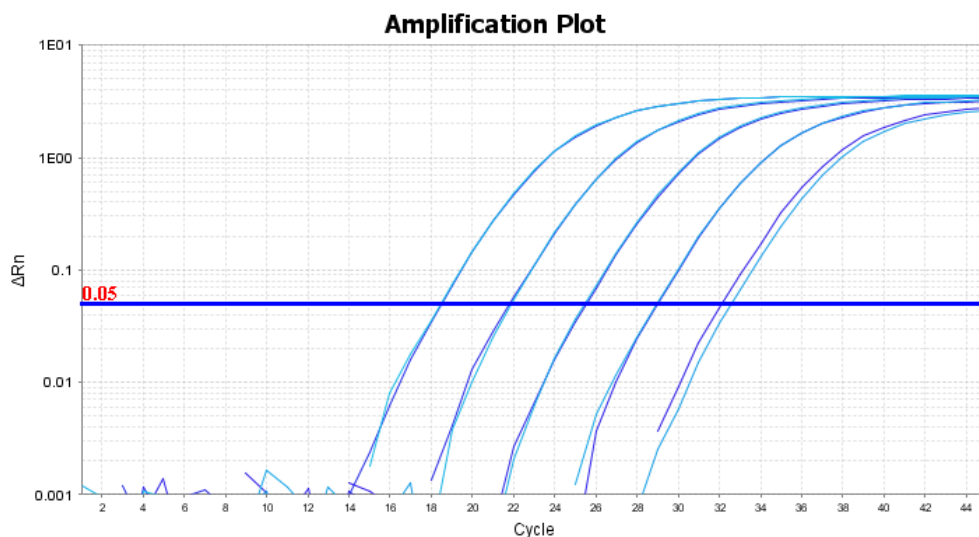
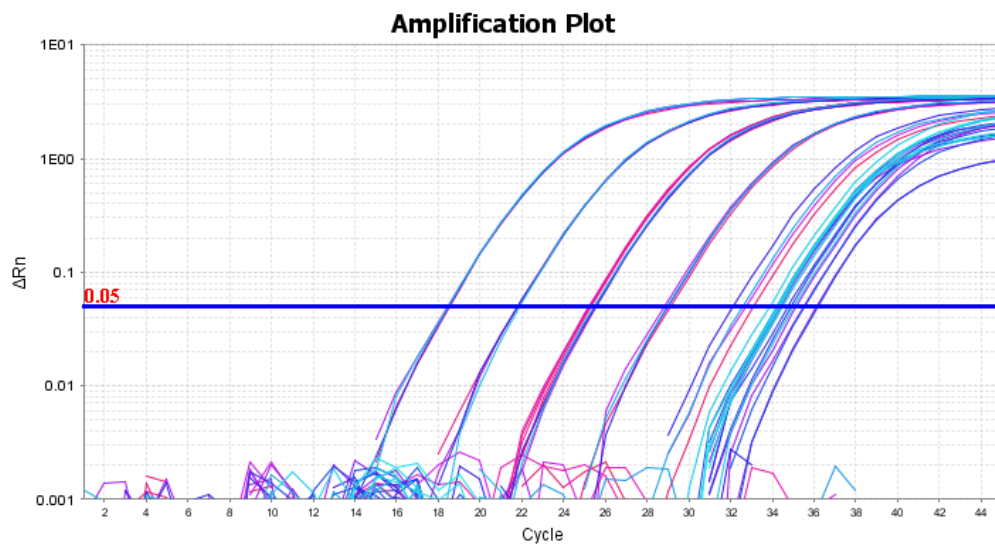


Fig.4: NoVGII – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.5: HAV – curva std

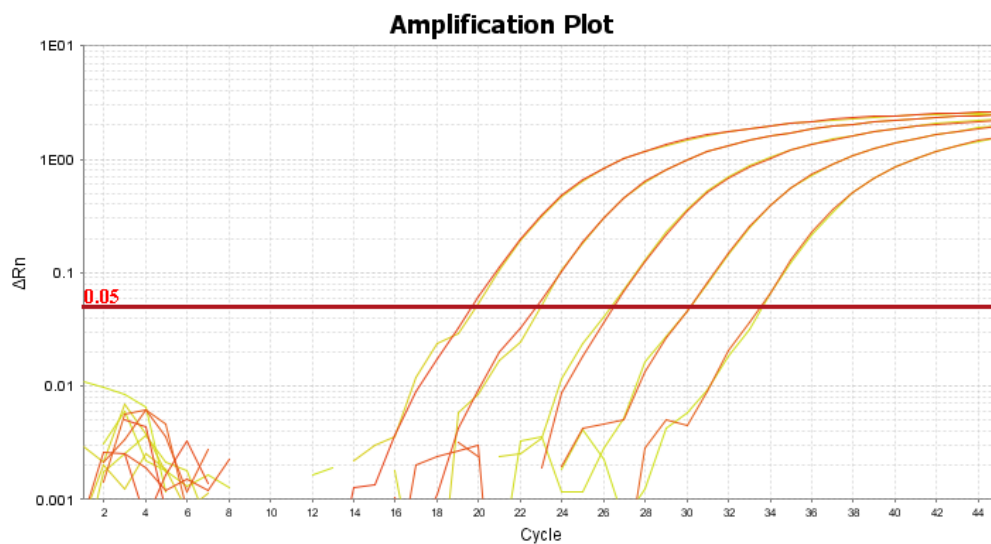
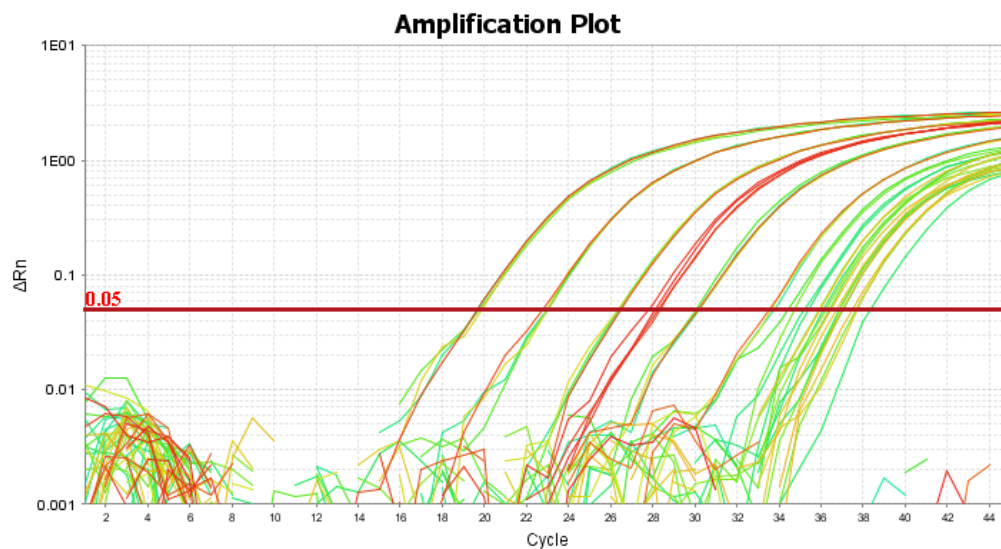


Fig.6: HAV – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.7: Mengo – curva std

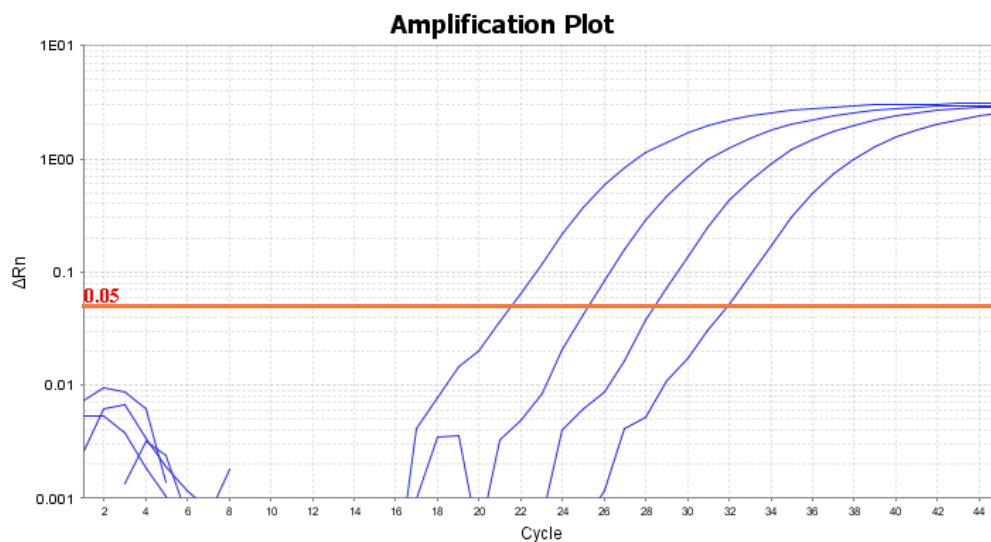
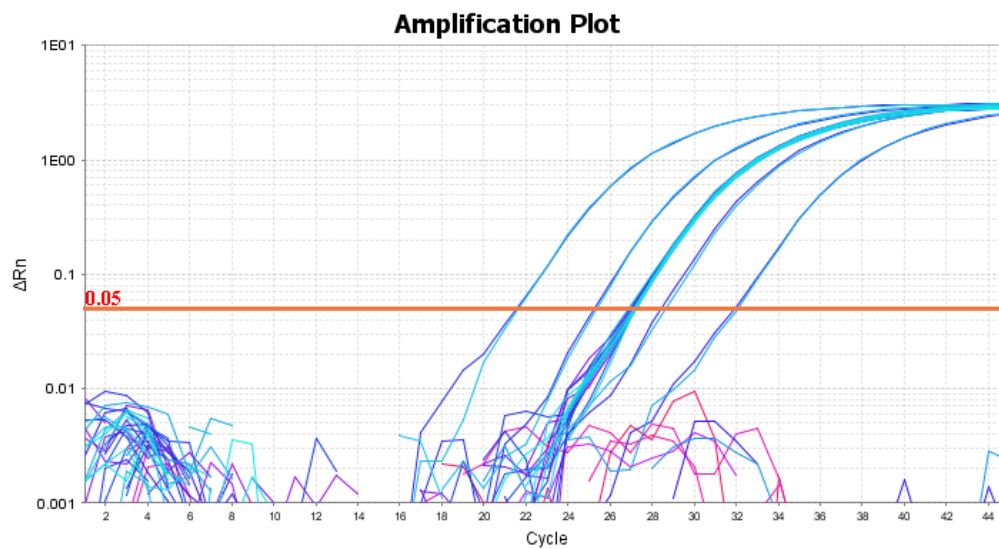


Fig.8: Mengo – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Kit FastVirus

Fig.9: NoVGI – curva stnd

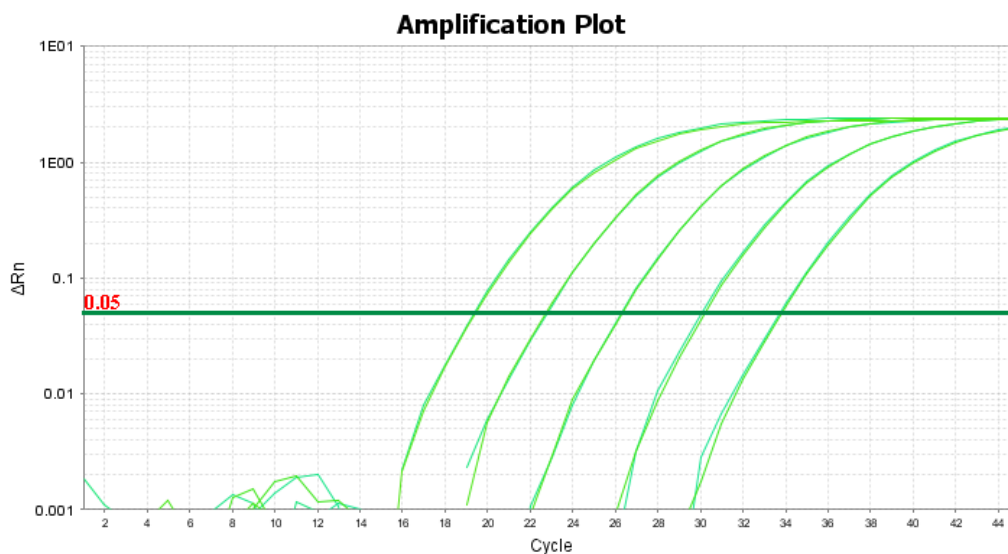
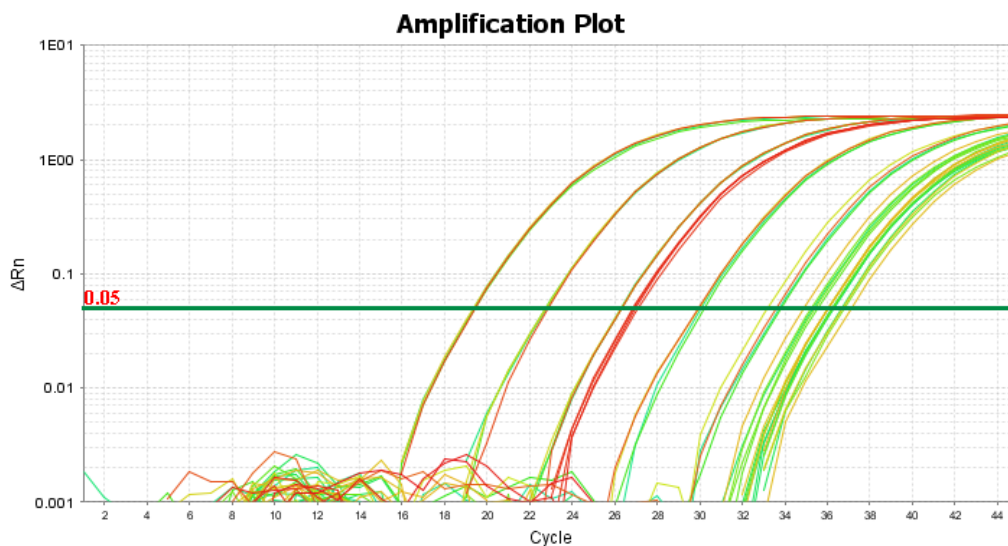


Fig.10: NoVGI – stnd e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.11: NoVGII – curva std

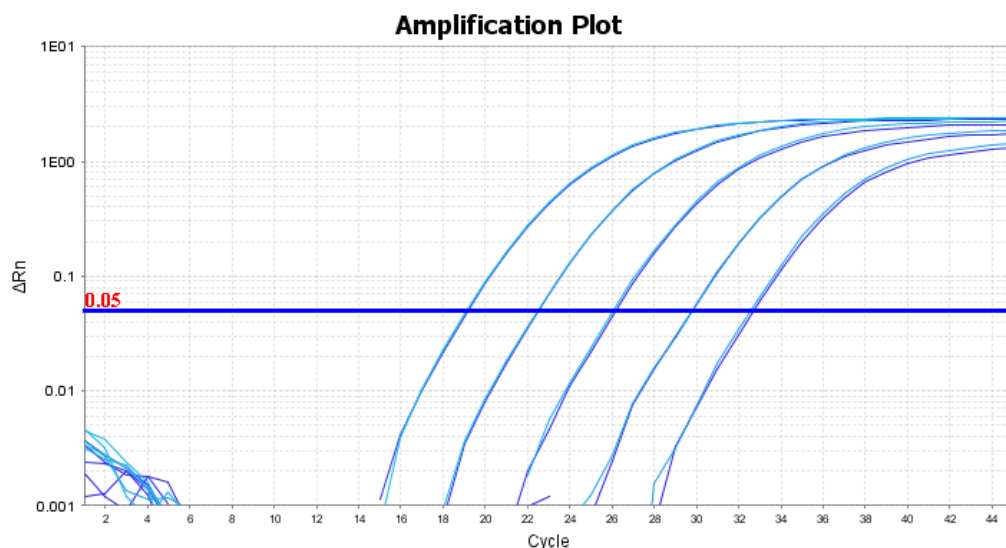
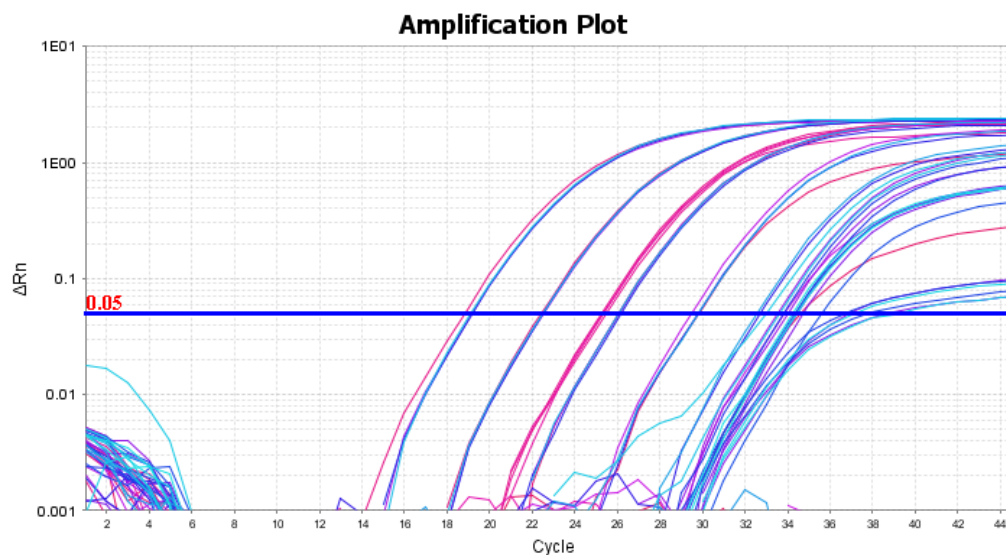


Fig.12: NoVGII – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.13: HAV – curva std

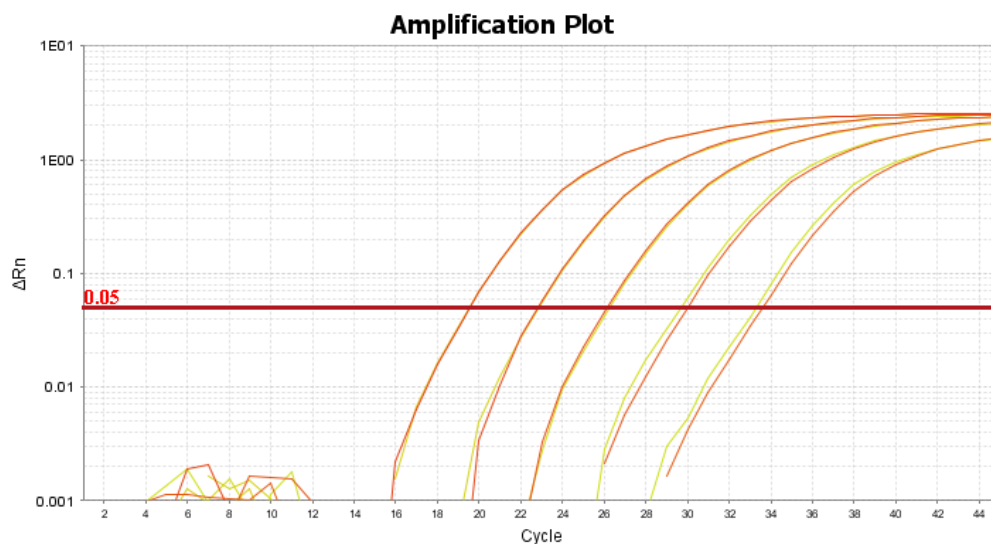
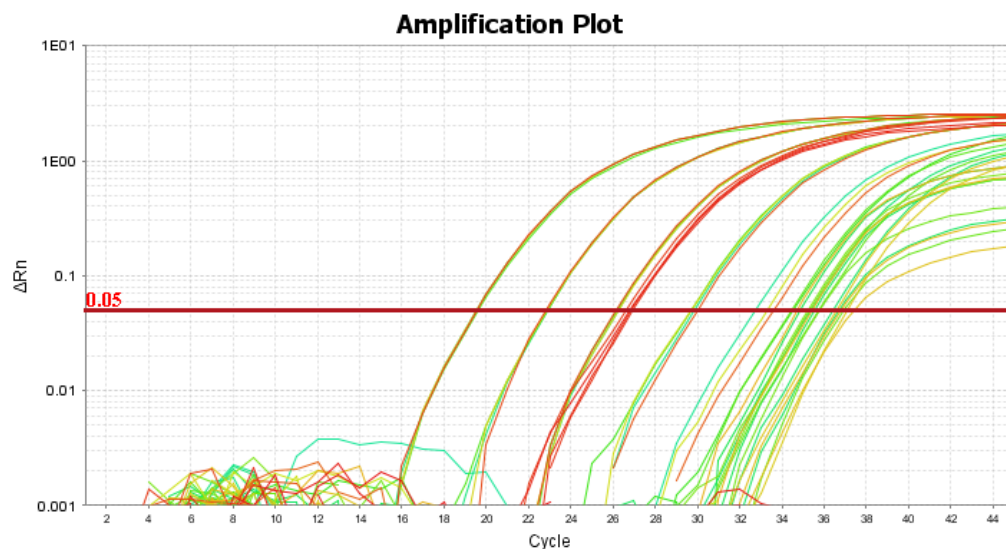


Fig.14: HAV – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.15: Mengo – curva std

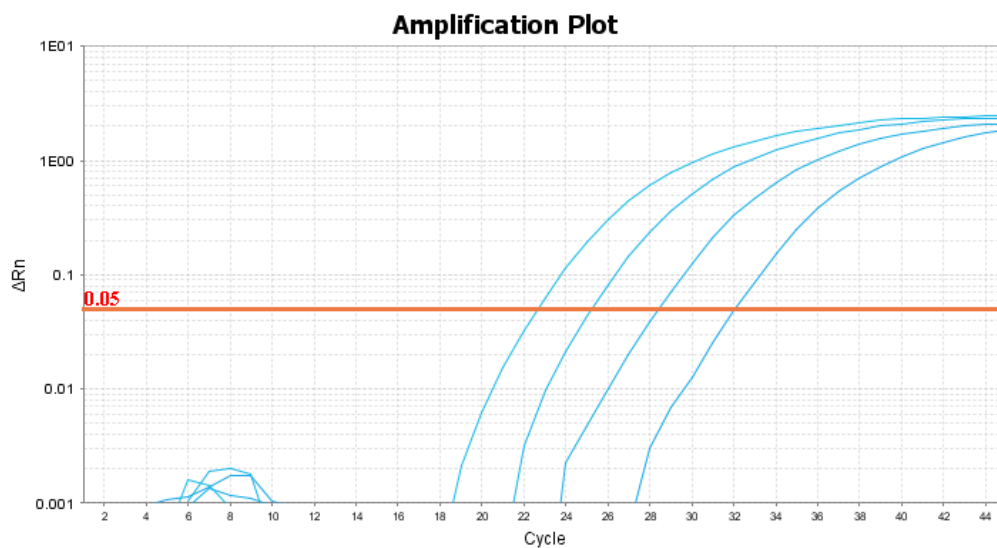
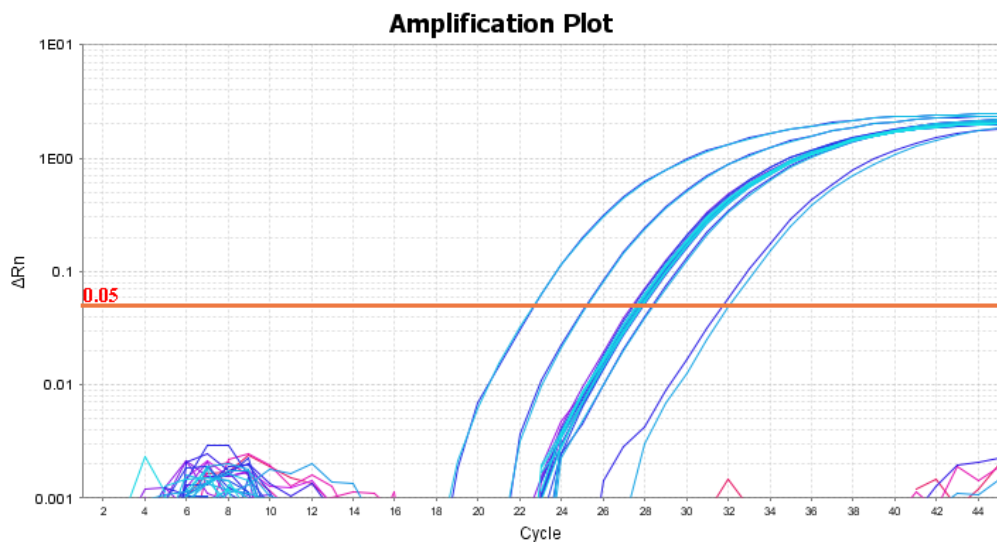


Fig.16: Mengo – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Kit VetMAX

Fig.17: NoVGI – curva std

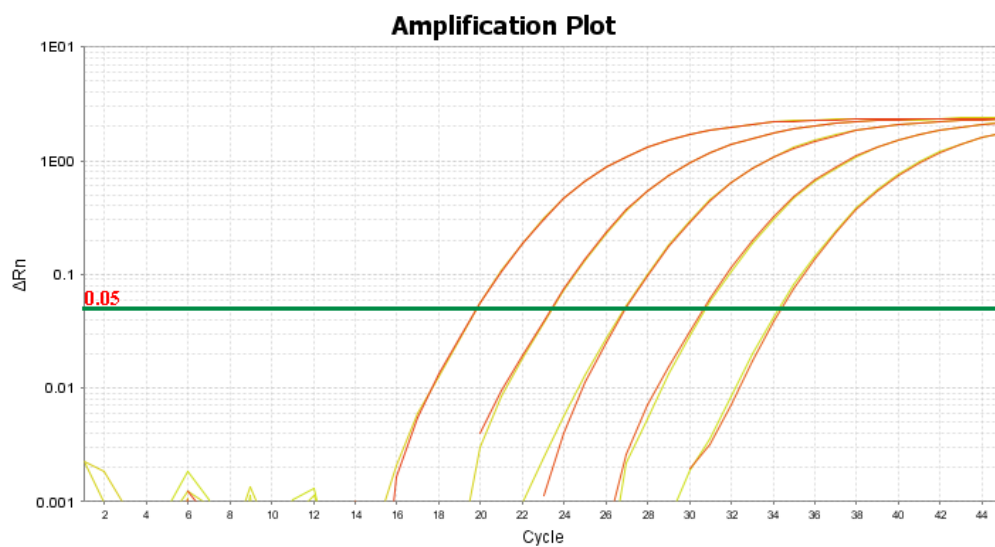
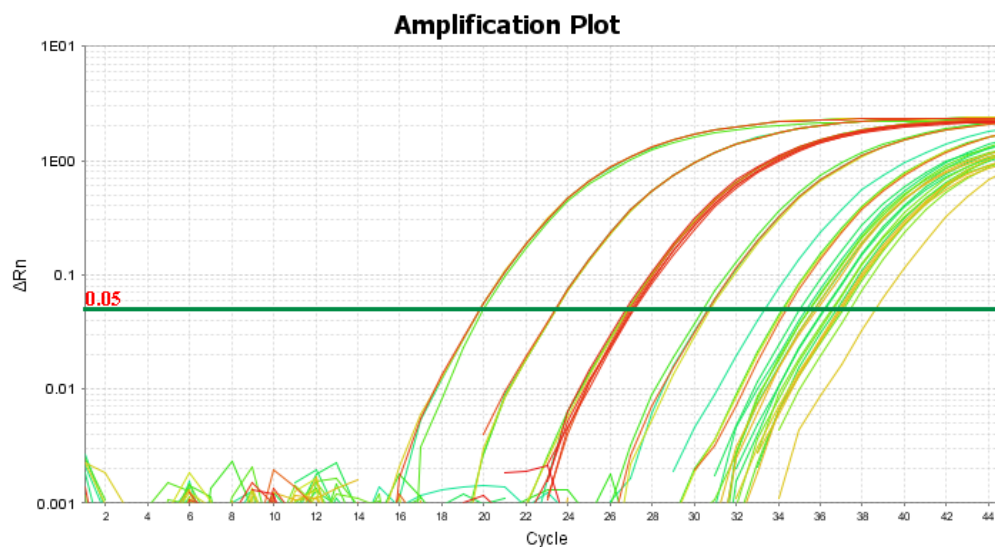


Fig.18: NoVGI – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.19: NoVGII – curva std

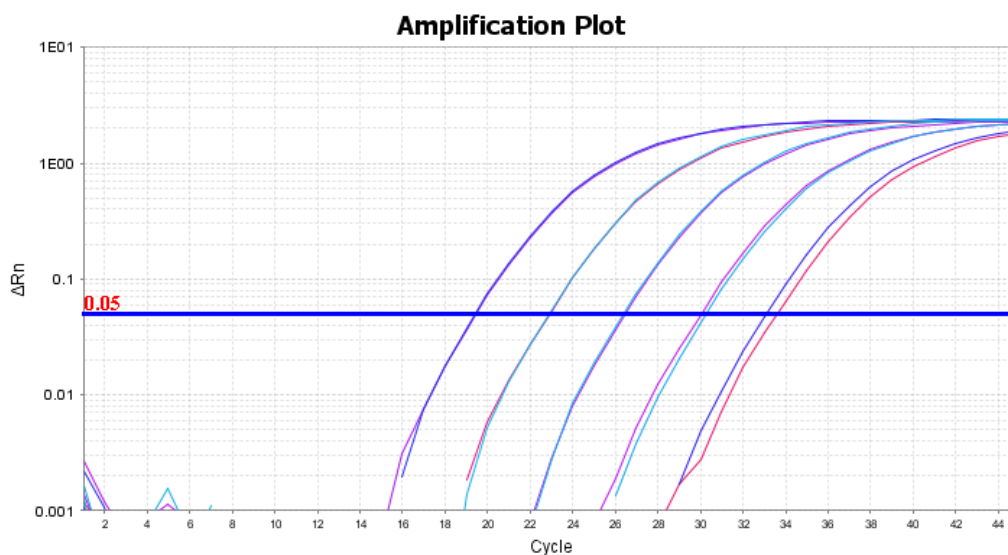
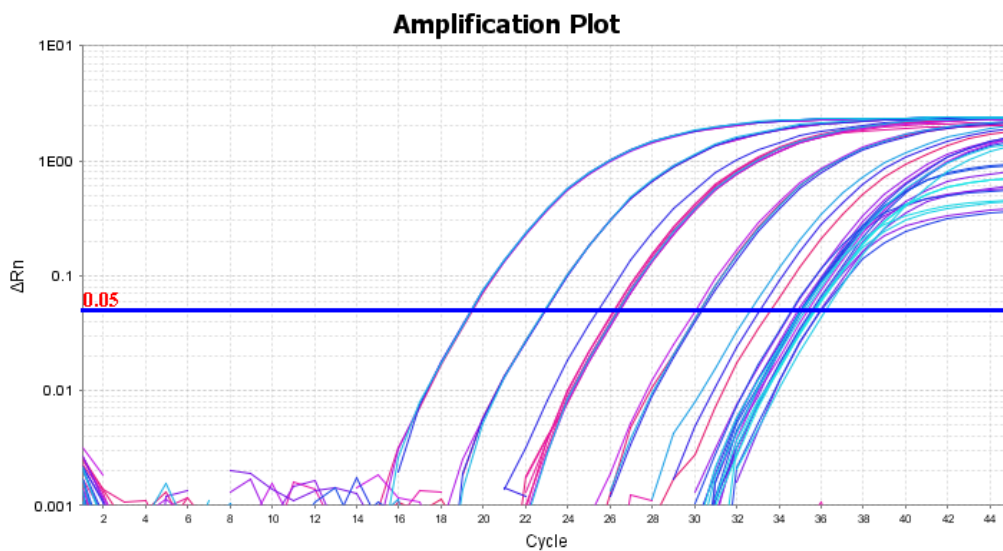


Fig.20: NoVGII – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.21: HAV – curva std

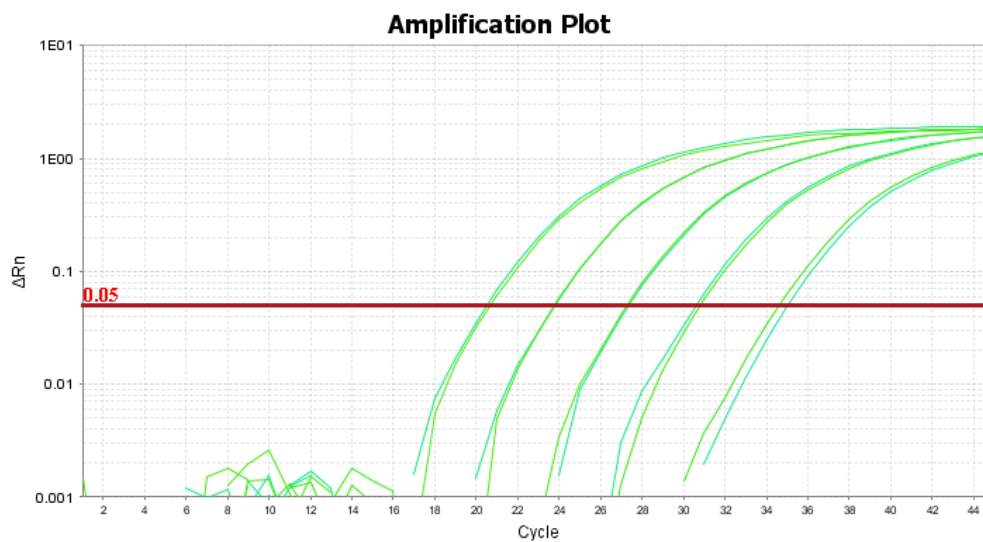
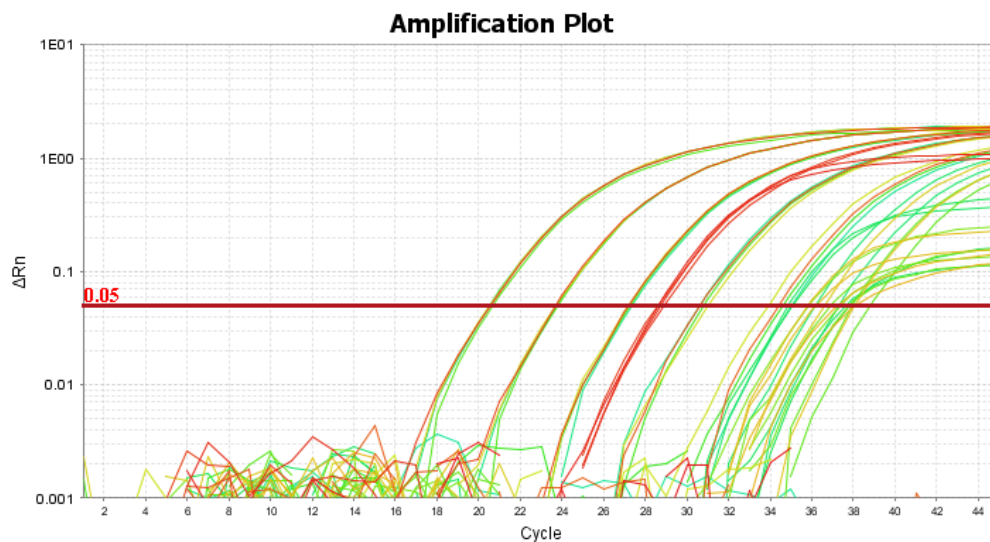


Fig.22: HAV – std e campioni





ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'
**Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria**

Reparto Sicurezza Microbiologica e Malattie a Trasmissione Alimentare

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Virus di origine Alimentare

Responsabile: dott.ssa Elisabetta Suffredini

Fig.23: Mengo – curva stnd

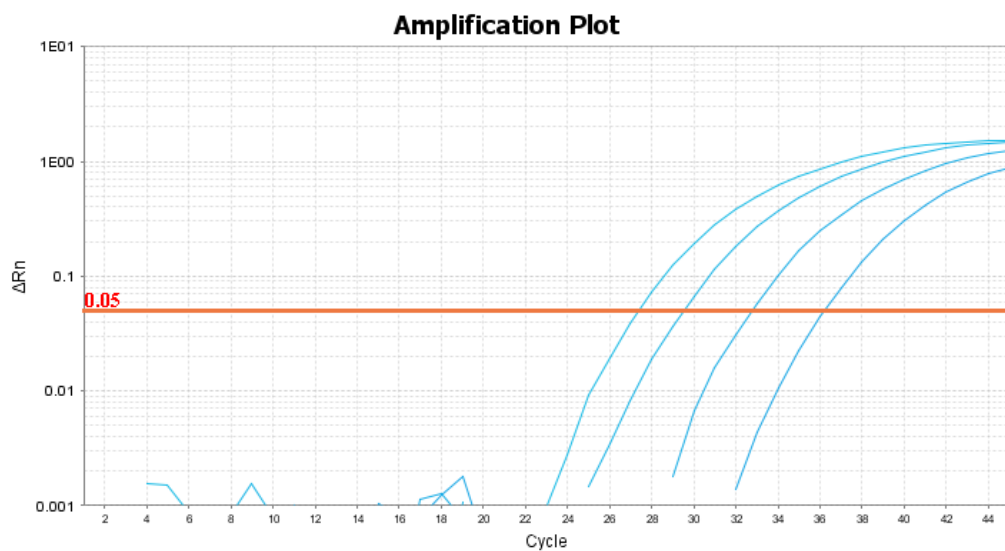


Fig.24: Mengo – stnd e campioni

