



XVI Congresso Nazionale
S.I.Di.L.V.
30 settembre - 2 ottobre 2015
Montesilvano (PE)

Confronto delle performance di NucliSense miniMAG (Biomérieux) ed High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) per l'estrazione di RNA e la rilevazione di Norovirus GII da matrici vegetali

Apra Giuseppe*, Battistelli Noemi, D'Agostino Krizia, Boni Arianna, D'Angelantonio Daniela, Pomilio Francesco, Migliorati Giacomo

Reparto di Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo
*Presenting author



Introduzione

In seguito alla grave epidemia di epatite A da frutti rossi che ha colpito l'Italia nel 2013 con 1444 casi umani riportati (1), si è resa indispensabile la messa a punto di una metodica in grado di rilevare anche piccole quantità di virus in matrici vegetali.

Nel Maggio del 2013 è stata pubblicata la ISO 15216 (2) allo scopo di valutare la presenza di genoma di virus (norovirus genogruppo I e II e virus dell'epatite A) in matrici alimentari. Tale procedura è particolarmente indagosa, soprattutto nella fase che riguarda la concentrazione e l'estrazione di virus dalle matrici vegetali. Esse sono infatti ricche di sostanze inibenti che possono interferire durante le successive fasi di Real-Time reverse transcription Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR). Tali sostanze, infatti, concentrate e non opportunamente eliminate nelle fasi di concentrazione previste nella metodica, possono influenzare negativamente l'efficacia di amplificazione e quella di recupero della prova, comportando alcune difficoltà nell'interpretazione dei risultati.

Nel presente lavoro è stata focalizzata l'attenzione su matrici vegetali a foglia di prima e quarta gamma e sul target norovirus genogruppo II (NoVGII). Sono state quindi confrontate le performance di estrazione di due tecniche riportate nella ISO15216, il NucliSense miniMAG (NSmM, Biomérieux) ed il kit High Pure Viral Nucleic Acid (HPV, Roche).

I risultati hanno mostrato una migliore performance del NSmM, espressa in termini di una migliore efficienza di amplificazione e di estrazione.

Keywords

Efficienza di amplificazione/estrazione,
Norovirus genogruppo II,
Vegetali a foglia

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 28 campioni di verdure a foglia (12 di prima gamma e 16 di quarta gamma) per valutare la presenza di NoVGII. La metodica utilizzata è stata quella descritta nella ISO15216-2:2013 (2).

Due aliquote di 25 gr per campione sono state addizionate separatamente a 40 ml di buffer TGBE (tris glycine beef extract) e trasferite in buste da stomacher con filtro. Sono stati quindi aggiunti 10µl di mengovirus (10X), utilizzato come controllo del processo di concentrazione e di estrazione. Il mengovirus è stato fornito dall'Istituto Superiore di Sanità insieme ai controlli di amplificazione (EC) per NoVGII (10X), utilizzati successivamente nella real-time RT-PCR. Prima dell'uso, tutti i controlli sono stati diluiti 1:10. Al termine della procedura di concentrazione, i pellet dei campioni risultanti dalle fasi di centrifugazione sono stati risospesi in 200µl di PBS per l'estrazione dell'RNA con il kit HVP e in 500µl per l'estrazione con il NSmM.

I primer ed i probe utilizzati sono elencati nella metodica ISO 15216-2.

La real-time RT-PCR è stata eseguita utilizzando RNA UltraSense One-Step RT-PCR (Invitrogen). In ogni pozzetto della piastra da real-time sono stati posti 20µl di mastermix. Per tutti i campioni sono stati testati 5µl di RNA tal quale e 5µl di RNA diluito 1:10.

Ogni campione è stato inoltre fortificato con il controllo di amplificazione (EC RNA) e con il mengovirus ed è stata allestita una curva standard con diluizioni seriali 1:10 del controllo di processo (mengovirus da 1:10 a 1:10000).

L'analisi dei risultati ha compreso la valutazione dell'eventuale positività dei campioni trattati in considerazione dei parametri di efficienza di amplificazione e di estrazione, conformemente a quanto riportato nella norma ISO.

Risultati e discussione

L'efficienza di amplificazione è risultata accettabile per tutti i campioni estratti con il NSmM alla diluizione tal quale ed alla diluizione 1:10. Tredici campioni sui 28 estratti con HPV hanno invece mostrato un'efficienza di amplificazione non accettabile alla diluizione tal quale. La metodica ISO prevede che in caso di un'efficienza di amplificazione non accettabile per un campione alla diluizione tal quale è possibile prendere in considerazione la diluizione 1:10. Tre dei 13 campioni estratti con HPV hanno continuato a mostrare un'efficienza di amplificazione non accettabile anche alle diluizioni 1:10 (Tabella 1).

Per quanto concerne la rilevazione di mengovirus alla diluizione tal quale, in tutti i campioni estratti con NSmM si è rilevato il genoma mentre in 6 campioni su 28 estratti con HPV non si è verificata l'amplificazione del controllo di processo. Tra i 22 campioni per i quali è stato rilevato il mengovirus al tal quale e per entrambe le tecniche di estrazione, i cicli soglia (Ct) di inizio amplificazione sono risultati più bassi in 16 campioni estratti con NSmM con un valore medio di ΔCt (Ct HPV- Ct NSmM) di 1.10. In relazione alla diluizione 1:10, tutti i campioni estratti con entrambe le tecniche hanno consentito di rilevare genoma di mengovirus, ma 17 campioni su 28 estratti con NSmM hanno presentato valori di Ct di inizio amplificazione più bassi rispetto a quelli estratti con HPV, con un valore medio di ΔCt (Ct HPV- Ct NSmM) complessivo di 0.45 (Tabella 2).

Per quanto riguarda, invece, l'espressione finale dei risultati derivanti dall'analisi complessiva dei parametri di efficienza di amplificazione e di estrazione riportati nella ISO è emerso che, per 13 campioni su 28 estratti con il kit HPV, non è stato possibile esprimere il risultato alla diluizione tal quale. Considerando invece il fattore di diluizione dei campioni 1:10, 10 di essi possono essere considerati negativi mentre per 3 campioni non è stato possibile esprimere un risultato a causa delle sostanze interferenti presenti nella matrice vegetale. Per quanto concerne invece i campioni estratti con NSmM, la totalità di essi ha fornito un risultato negativo per RNA virale di NoVGII già a partire dai campioni non diluiti (Tabella 3).

In conclusione si può affermare che il metodo di estrazione del NSmM confrontato con HPV ha fornito risultati nettamente migliori in termini di efficienza di amplificazione e di estrazione, consentendo di esprimere il risultato di negatività nel 100% dei campioni non diluiti. È pertanto possibile reputare il sistema di estrazione NSmM più idoneo rispetto al sistema HPV per il trattamento di matrici vegetali ricche di sostanze inibenti come gli ortaggi a foglia.

Tabella 1. Confronto ed espressione dei risultati di efficienza di amplificazione e di estrazione dei campioni non diluiti e diluiti 1:10, estratti con i metodi HPV e NSmM.

N.	Matrice vegetale	Efficienza di amplificazione Campioni non diluiti		Efficienza di amplificazione campioni diluiti 1:10	
		HPV	NSmM	HPV	NSmM
1	Lattuga (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Inaccettabile	Accettabile
2	Lattuga (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
3	Lattuga (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
4	Radicchio (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Inaccettabile	Accettabile
5	Lattuga (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
6	Radicchio (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
7	Lattuga (IV gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
8	Indivia (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
9	Cicoria (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
10	Lattuga (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
11	Cicoria (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
12	Valerianella (IV gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
13	Lattuga (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
14	Indivia (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
15	Radicchio (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
16	Radicchio (I gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Inaccettabile	Accettabile
17	Cicoria (I gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
18	Cicoria (I gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
19	radicchio(I gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
20	Lattuga (I gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
21	Cicoria (IV gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
22	Rucola (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
23	Cicoria (IV gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
24	Cicoria (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
25	Indivia (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
26	Cicoria (IV gamma)	Inaccettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
27	Lattuga (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile
28	Cicoria (IV gamma)	Accettabile	Accettabile	Accettabile	Accettabile

Tabella 2. Confronto ed espressione dei valori di Ct di amplificazione del genoma di mengovirus nei campioni non diluiti e diluiti 1:10 estratti con i metodi HPV e NSmM.

N.	Matrice vegetale	Valori di Ct mengovirus campioni non diluiti			Valori di Ct mengovirus campioni diluiti 1:10		
		HPV	NSmM	ΔCt	HPV	NSmM	ΔCt
1	Lattuga (I gamma)	> 45,00	28,06	Non det.*	33,55	29,79	3,77
2	Lattuga (I gamma)	> 45,00	27,14	Non det.*	32,26	29,94	2,32
3	Lattuga (I gamma)	32,6	27,18	5,42	30,78	29,98	0,8
4	Radicchio (I gamma)	> 45,00	27,1	Non det.*	33,2	30,1	3,1
5	Lattuga (I gamma)	33,03	27,07	5,97	32,28	29,63	2,64
6	Radicchio (I gamma)	> 45,00	29,42	Non det.*	33,95	31,98	1,97
7	Lattuga (IV gamma)	35,41	27,36	8,05	33,02	30,62	2,4
8	Indivia (IV gamma)	28,63	27,35	1,28	31,55	30,25	1,3
9	Cicoria (IV gamma)	27,93	27,26	0,67	31,57	30,34	1,22
10	Lattuga (IV gamma)	27,65	27,52	0,13	30,75	30,47	0,29
11	Cicoria (IV gamma)	27,71	27,61	0,1	31,11	30,91	0,2
12	Valerianella (IV gamma)	29,58	29,6	-0,02	30,71	32,72	-2,01
13	Lattuga (IV gamma)	27,3	27,93	-0,64	30,44	30,6	-0,15
14	Indivia (IV gamma)	27,84	28,75	-0,91	30,46	32,45	-1,99
15	Radicchio (I gamma)	> 45,00	31,6	Non det.*	32,7	33,81	-1,11
16	Radicchio (I gamma)	> 45,00	30,81	Non det.*	33,11	32,1	1,01
17	Cicoria (I gamma)	29,67	29,53	0,14	31,77	32,1	-0,33
18	Cicoria (I gamma)	28,33	31,36	-3,03	31,74	34,1	-2,37
19	Radicchio(I gamma)	28	31,38	-3,38	31,96	33,65	-1,69
20	Lattuga (I gamma)	27,62	29,22	-1,6	31,5	32,07	-0,57
21	Cicoria (IV gamma)	30,14	28,79	1,35	31,51	31,96	-0,45
22	Rucola (IV gamma)	29,23	28,08	1,14	32,66	31,4	1,26
23	Cicoria (IV gamma)	31,53	29,33	2,2	31,18	31,91	-0,73
24	Cicoria (IV gamma)	30,25	29,42	0,84	31,23	32,42	-1,2
25	Indivia (IV gamma)	29,58	28,95	0,64	32,15	32,15	0,01
26	Cicoria (IV gamma)	30,42	28,43	1,98	31,78	31,78	0,01
27	Lattuga (IV gamma)	28,9	28,55	0,34	31,93	31,48	0,45
28	Cicoria (IV gamma)	31,58	28,01	3,57	33,34	30,9	2,44

* = ΔCt non determinabile per assenza di amplificazione del genoma di mengovirus in seguito ad estrazione del campione con metodica HPV

Tabella 3. Confronto dei risultati per il target NoVGII mediante estrazione dei campioni con HPV e NSmM.

N.	Matrice vegetale	Risultati Campioni non diluiti		Risultati Campioni diluiti 1:10	
		HPV	NSmM	HPV	NSmM
1	Lattuga (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Risultato non accettabile	Negativo
2	Lattuga (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
3	Lattuga (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
4	Radicchio (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Risultato non accettabile	Negativo
5	Lattuga (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
6	Radicchio (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
7	Lattuga (IV gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
8	Indivia (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Cicoria (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Lattuga (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	Cicoria (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Valerianella (IV gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
13	Lattuga (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Indivia (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Radicchio (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
16	Radicchio (I gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Risultato non accettabile	Negativo
17	Cicoria (I gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Cicoria (I gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Radicchio(I gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Lattuga (I gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Cicoria (IV gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
22	Rucola (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Cicoria (IV gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
24	Cicoria (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Indivia (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Cicoria (IV gamma)	Risultato non accettabile	Negativo	Negativo	Negativo
27	Lattuga (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Cicoria (IV gamma)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Bibliografia

- ISO/TS 15216-1:2013. Microbiology of food and animal feed. Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR. Part 1: Method for qualitative detection.
- European Food Safety Authority. 2014. Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe. *EFSA Journal*, 12 (9), 3821.

