

Identificazione molecolare di virus enterici nelle acque ad uso alimentare per la prevenzione di malattie a trasmissione alimentare.

Renica Silvia^{1,2}, Foti Marina¹, Abeygunawardene Sasanka Harshani¹, Alteri Claudia^{2,3}, Andrea Cassingena¹

1 – ATS Milano, Laboratorio di Prevenzione S.S. Microbiologia e Biologia Molecolare

2 – Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Oncologia ed Emato-Oncologia

3 – Fondazione IRCCS Ca' Granda Policlinico, Unità di Microbiologia e Virologia

La trasmissione di patologie virali attraverso alimenti è un fenomeno molto frequente: circa il 70% delle gastroenteriti acute ed il 10% delle diarree del viaggiatore hanno eziologia virale, con il virus dell'Epatite A (HAV) ed il Norovirus tra le cause principali.

Questo lavoro è stato svolto per accreditare secondo la ISO 17025 il metodo per il monitoraggio e la sorveglianza del virus dell'Epatite A, del Norovirus GI e GII su acque in bottiglia e acque destinate al consumo umano utilizzando metodiche di rilevazione qualitative conformi alla ISO 15216-2:2019.

Le prove sono state eseguite contaminando artificialmente una matrice di acqua ad uso alimentare, utilizzando sospensioni virali titolate di HAV, Norovirus GI e Norovirus GII, oltre al Mengovirus come controllo. I campioni sono stati estratti con kit commerciali seguendo le istruzioni fornite con i kit e successivamente amplificati in RT Real-Time PCR utilizzando primer e probe indicati dalla ISO 15216-2:2019.

Gli esperimenti sono stati suddivisi in tre step secondo i requisiti indicati nel documento “*EURL Guidance document for verification of ISO 15216-2:2019*”. Con lo Step 1 viene verificata la presenza di contaminazione naturale del campione, l'eventuale inibizione alla RT-PCR e l'efficienza di estrazione. Nello step 2 viene stimato l'effetto matrice legato all'alimento. Nello step 3 vengono replicate le contaminazioni dei campioni per il calcolo del LOD₅₀ e della sensibilità, allestendo sei diluizioni seriali in base 5 (1:5) per coprire diversi livelli di contaminazione (alti, medi e bassi) a partire da circa 10.000 copie/campione. Il LOD₅₀ espresso come copie/ml è stato quantificato in 0,065 (HAV), 0,024 (Norovirus GI) e 0,018 (Norovirus GII). La sensibilità è stata del 100% ad alti, medi e bassi livelli di contaminazione per HAV [66,8 copie/ml, 13,4 copie/ml, 2,7 copie/ml], per Norovirus GI [18.9 copie/ml, 3.8 copie/ml, 0.76 copie/ml] e per Norovirus GII [29.3 copie/ml, 1.2 copie/ml, 0.76 copie/ml].

I risultati ottenuti hanno superato i requisiti relativi a i) inibizione di estrazione, ii) efficienza di estrazione e iii) LOD₅₀ indicati nel documento “*EURL Guidance document for verification of ISO 15216-2:2019*” ed hanno consentito di superare con esito positivo la visita di sorveglianza dell'Ente di Accreditamento.

Il metodo è stato quindi introdotto nella routine di laboratorio per rilevare la presenza di HAV, Norovirus GI e GII consentendone l'utilizzo nell'ambito del controllo ufficiale.