



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

APPLICAZIONE DELLA ISO/TS 15216:2013:

Norovirus ed Epatite A

Sarah Lovari

D.O. Controllo degli Alimenti

Laboratorio di Biotecnologie applicate alla sicurezza alimentare

Roma 6-7 ottobre 2015





I virus:

Microrganismi infettivi di piccolissime dimensioni (circa 100 volte più piccoli di un batterio tipo) composti da un genoma a DNA o RNA racchiuso in un rivestimento proteico.

Virus negli alimenti

Dati epidemiologici e clinici indicano una crescente importanza dei virus come causa di malattie trasmesse con gli alimenti, il cui numero è ancora sottostimato.

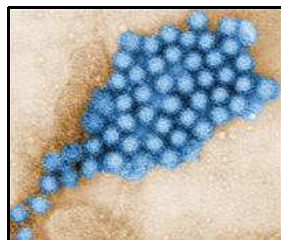


Virus negli alimenti

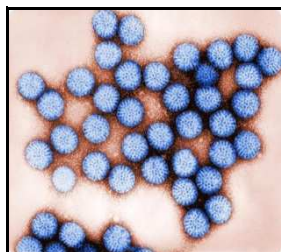
- ✓ **Non possono replicarsi negli alimenti**
- ✓ **Diffusione oro-fecale attraverso la contaminazione di acqua e cibo con materiale fecale**
- ✓ **Eliminati in grandi quantità con le feci (10^8 - 10^{10} /g)**
- ✓ **Dose infettante molto bassa (10-100 particelle virali)**
- ✓ **Le particelle virali sono molto stabili nell'ambiente, al di fuori dell'ospite, a valori estremi di pH, a trattamenti enzimatici, essiccazione, congelamento e trattamenti UV**



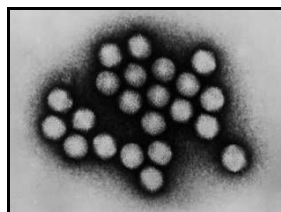
Virus trasmessi con gli alimenti e le acque: virus enterici



Calicivirus:
Norovirus
Saprovirus

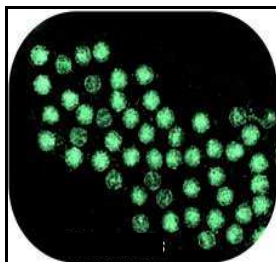


Rotavirus



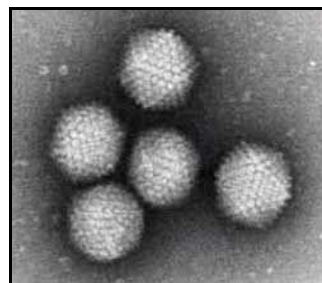
Adenovirus
tipo 40 e 41

Enterovirus

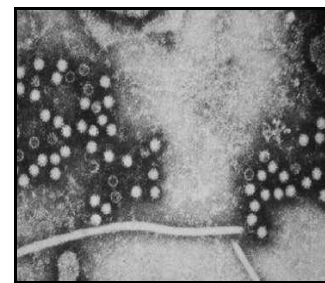


Virus che si replicano nell'intestino umano, ma che causano malattia dopo essere migrati in altri organi, come il sistema nervoso centrale o il fegato

Virus che causano
gastroenteriti



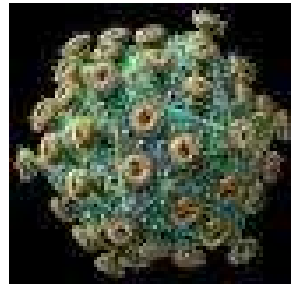
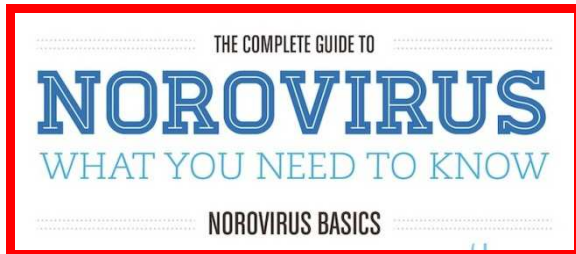
Epatite A



Epatite E

Virus dell'epatite a trasmissione oro-fecale

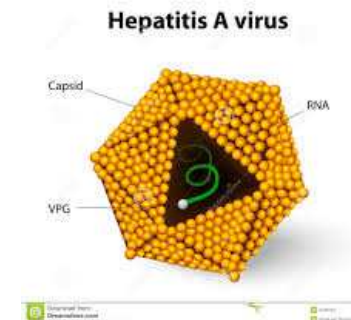




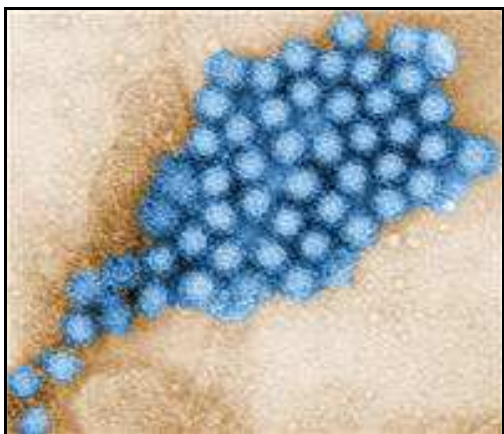
- ✓ **Famiglia Caliciviridae**
- ✓ **Privi di involucro esterno**
- ✓ **Capside icosaedrico con depressioni superficiali a forma di calice**
- ✓ **Singolo filamento di RNA (ssRNA) a polarità positiva (~7,5 Kb)**



- ✓ **Famiglia Picornaviridae**
- ✓ **Privi di involucro esterno**
- ✓ **Piccole dimensioni**
- ✓ **Singolo filamento di RNA (ssRNA) a polarità positiva (~7,5 Kb)**



Virus trasmessi con gli alimenti



Norovirus (virus Norwalk)

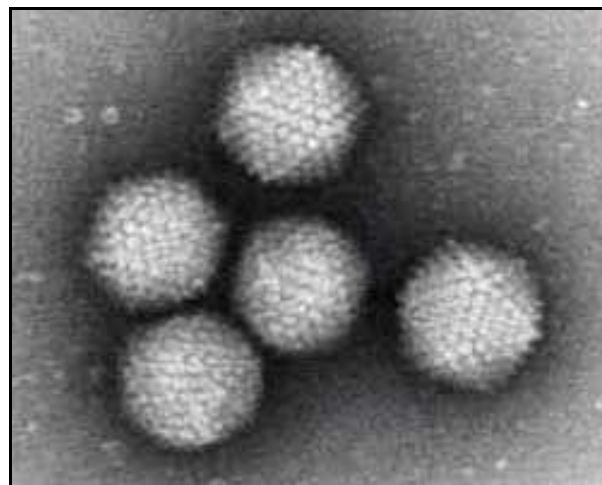
Causa gastroenterite: diarrea, vomito incoercibile, dolori addominali
Esordio acuto dopo 12-72 ore d'incubazione
Si risolve in circa 48 ore

Epatite A (HAV)

Causa grave infiammazione epatica: astenia, febbre, inappetenza, nausea, cefalea, mialgia, dolore addominale, ittero.

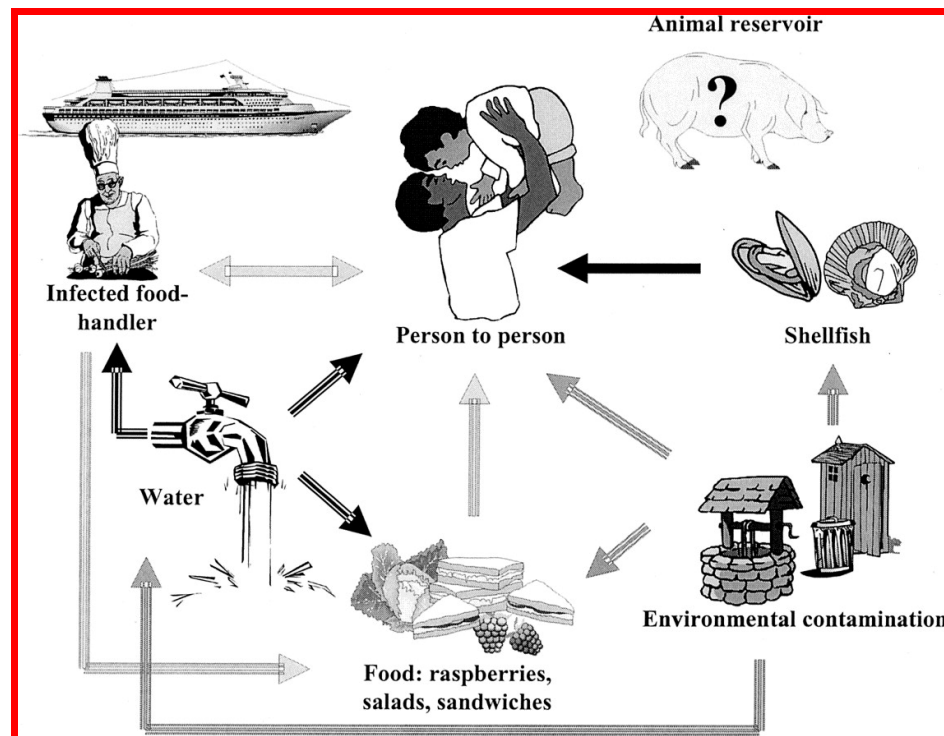
Compare dopo 2-7 settimane dal contagio

Regredisce spontaneamente dopo circa 2 mesi



Vie di trasmissione:

- ☞ Contatto diretto uomo-uomo
- ☞ Operatori a contatto con il cibo
- ☞ Consumo d'acqua contaminata (trasmissione diretta)
- ☞ Consumo di alimenti irrigati o lavati con acque contaminate (trasmissione indiretta)
- ☞ Contaminazione degli alimenti in qualsiasi punto della filiera alimentare (dai punti di raccolta alla tavola)



Alimenti associati a malattie virali

MOLLUSCHI

FRUTTA E VERDURA CRUDA



Alimenti:

problemi nell'individuazione delle contaminazioni virali

- I prodotti contaminati appaiono normali alla vista, all'olfatto, al tatto ed al gusto (qualità organolettiche inalterate)
- Non c'è correlazione tra contaminazioni batteriche e virali
- Metodi tradizionali poco sensibili
- Scarsa disponibilità delle metodiche di analisi e di impiego routinario delle stesse
- Metodi molecolari più sensibili, ma ancora non disponibili in tutti i laboratori di analisi



Metodi tradizionalmente usati per la diagnosi di infezione da virus:

**Non applicabili alla matrice
alimento**

	<u>Svantaggi</u>
Isolamento in colture cellulari	Tecnica estremamente lunga-virus non coltivabili
Microscopia elettronica	Poco sensibile (10^6 particelle/ml)-operatore esperto
Saggi immunoenzimatici (ELISA)	Cross reattività
Immunofluorescenza	Poso sensibile-cross reattività

Vantaggi: distinguono tra particelle virali infettive e non infettive



Metodi molecolari:

- Applicabili alla matrice alimentare che ha spesso natura complessa e non omogenea
- Maggiore sensibilità (10^2 particelle/ml)
- Non richiedono la moltiplicazione virale: applicabili ai virus non coltivabili



Percentuali patogeni riscontrati in gastroenteriti

(Europa 1992-2000)

- Norwalk-like viruses 38%
- Epatite A 17%
- Rotavirus 2.7%
- Astrovirus 0.5%
- Salmonella 20%
- Non identificati 21.8%



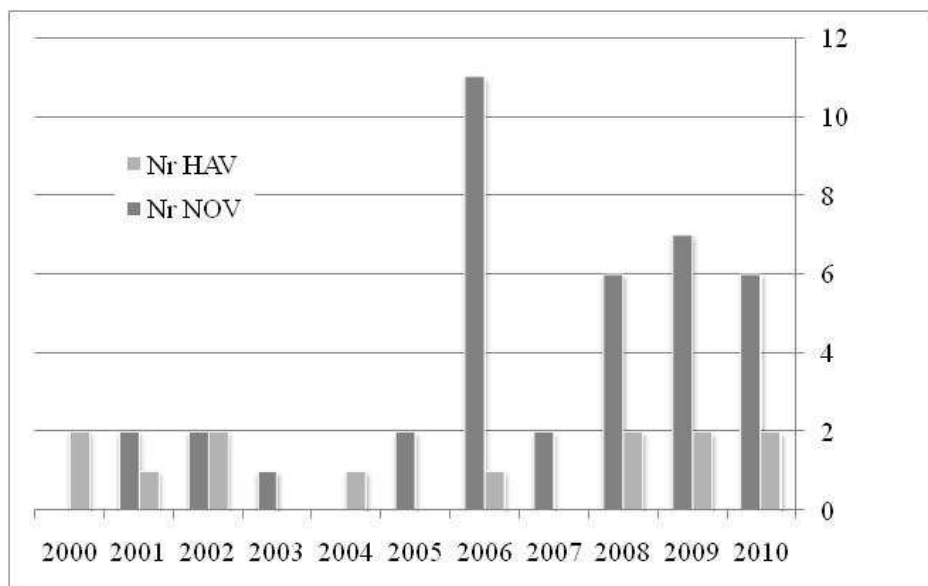


Figure 1: Number of notifications per year for suspected viral contamination of food products through RASFF from 2000 until March 2010.

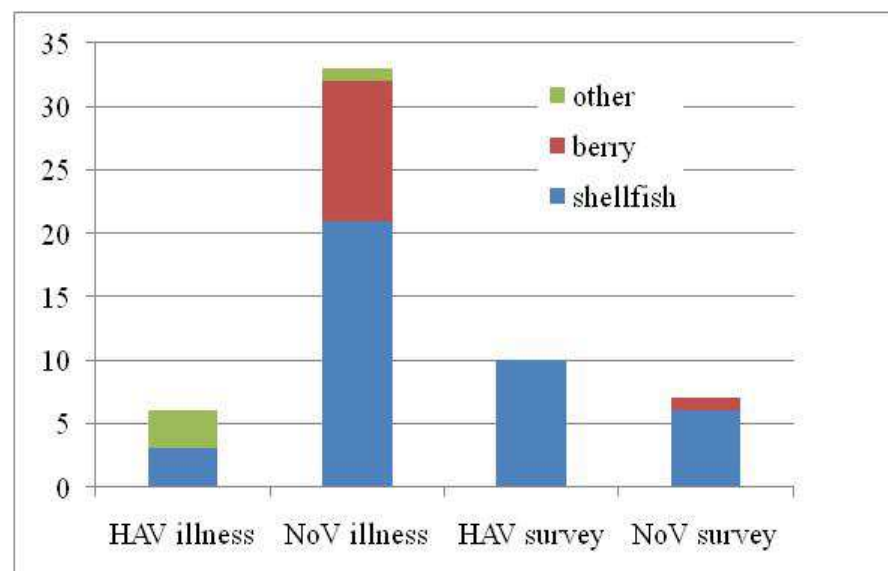


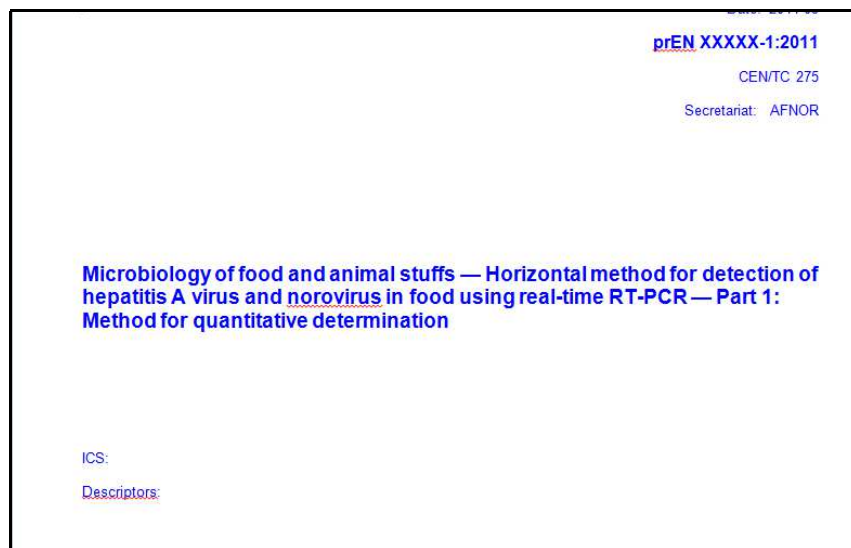
Figure 2: Number of notifications for suspected viral contamination of food products through RASFF from 2000 until March 2010, based on illness reports or virus detection in products



Necessità di definire metodi di riferimento (standardizzati ed internazionalmente riconosciuti) per NoV (GI e GII) e HAV

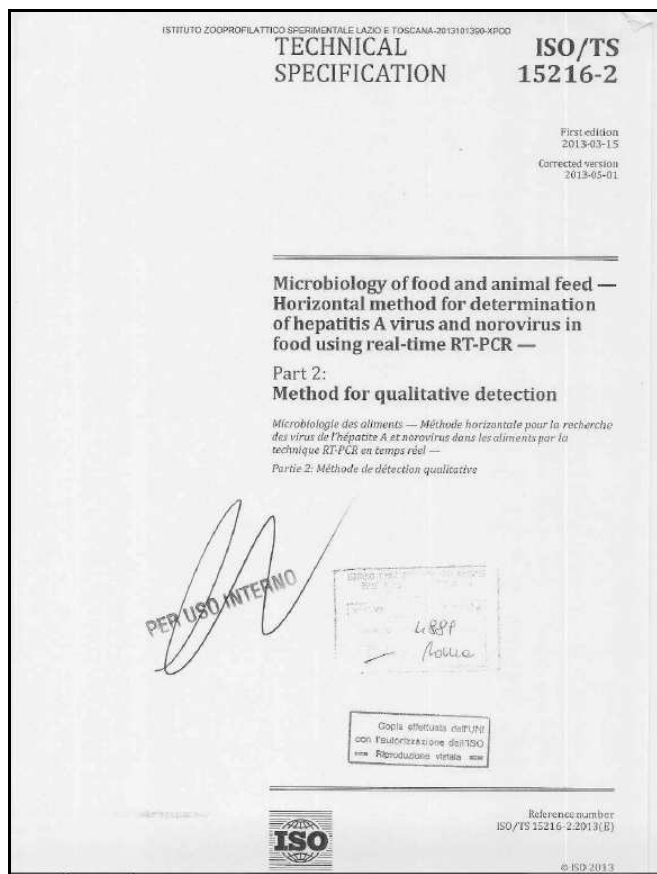
Gruppo CEN/TC275/WG6/TAG4 : inizio dei lavori nel 2004

- Superfici
- Frutta e vegetali
- Acqua
- Molluschi bivalve





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



ISO/TS 15216-2:2013

First edition 2013-05-01

Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR

Part 2:
Method for qualitative detection





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Epidemia da epatite A:2013

In totale sono stati notificati **1.463** casi di Epatite A dal 1° gennaio 2013 al 28 febbraio 2014.

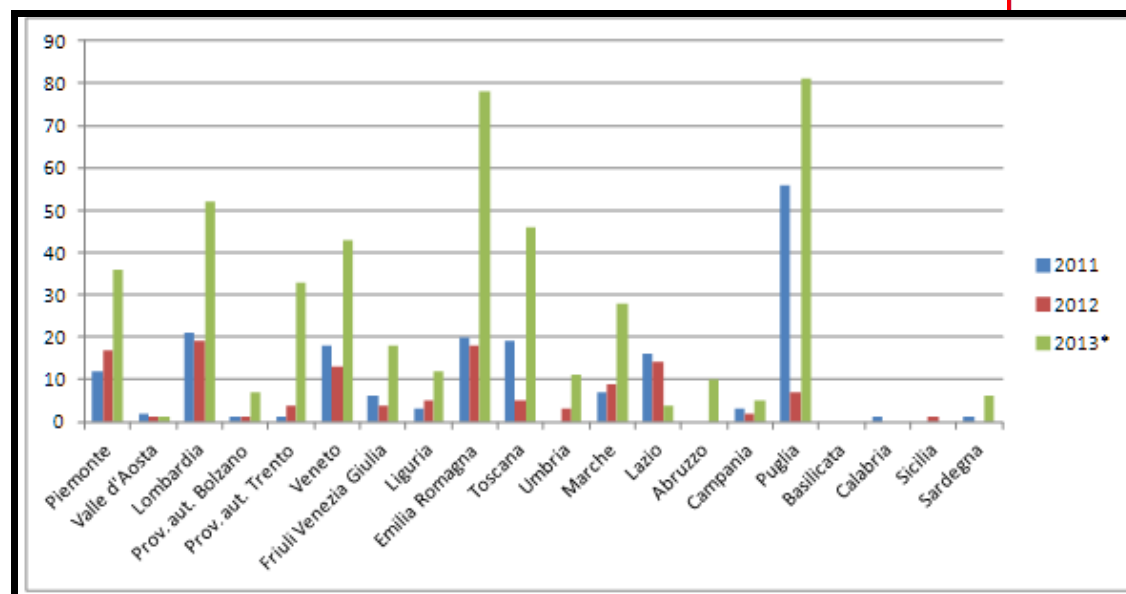


Figura 1. Numero di casi per Regione e per anno, nel periodo gennaio-giugno 2011-2013*(dati non definitivi)
Dati SEIEVA

ALTROCONSUMO
Il tuo punto di forza

Prova Altroconsumo
2 euro 2 mesi

Elettrodomestici Casa e energia Hi tech **Alimentazione** Salute Soldi Vita privata e famiglia Auto e moto Reclamare

Sei qui: Home > Alimentazione > Sicurezza alimentare > Epatite A e frutti di bosco: 1.300 i casi in Italia

Alimentazione

ATTENZIONE A
Epatite A e frutti di bosco: 1.300 i casi in Italia
18 settembre 2014

Frutti di bosco surgelati ancora nel mirino per il virus dell'epatite A: sono 1.300 i casi in Italia e l'emergenza non è ancora rientrata. Continuano i controlli del Ministero della Salute che consiglia di consumare questo prodotto sempre dopo una bollitura di almeno due minuti. Ecco la lista dei prodotti ritirati.

Continua la vicenda dei frutti di bosco surgelati prodotti in Italia, sotto accusa per la presenza del virus dell'epatite A.

I frutti di bosco ritirati
Da giugno 2013, a causa della sospetta contaminazione, sono stati ritirati a titolo precauzionale questi mix di frutti di bosco surgelati.

- Frutti di bosco congelati (1000 g), lotto 49/13 (scadenza 08/2014) - prodotto da

Hai subito un torto?
Fai sentire la tua voce con la nuova app di Altroconsumo
Ora basta!
SCARICA L'APP

DIREZIONE OPERATIVA, CONTROLLO DEGLI ALIMENTI
POSSUMUS
NOROVIRUS VIRUS EPATITE A (HAV) (PCR REAL TIME)

pag. 1 di 12



NOROVIRUS VIRUS EPATITE A (HAV) (PCR
REAL TIME)

Redatto:

S. LOVARI

Verificato Responsabile Struttura Semplice:

P. DE SANTIS

Verificato RQ:

M. GIARDINO

Approvato Responsabile di Struttura Complessa:

S. BILEI



DIREZIONE OPERATIVA, CONTROLLO DEGLI ALIMENTI
POSSUMUS
NOROVIRUS GENOGRUPPO GIL NOROVIRUS GENOGRUPPO GIL VIRUS EPATITE A (PCR
REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION)

pag. 1 di 1



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

NOROVIRUS GENOGRUPPO GIL NOROVIRUS
GENOGRUPPO GIL VIRUS EPATITE A
(PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION)

Redatto:

S. LOVARI

Verificato Responsabile Struttura Semplice:

P. DE SANTIS

Verificato RQ:

S. GUZZO

Approvato Responsabile di Struttura Complessa:

S. BILEI





FASI operative della ISO/TS 15216-2:2013

1. Estrazione del virus: le matrici alimentari oggetto della procedura (MOLLUSCHI, VEGETALI e FRUTTI DI BOSCO) sono spesso estremamente complesse e i virus target possono essere presenti in concentrazioni molto basse. E' pertanto indispensabile una fase di estrazione e concentrazione del virus dalla matrice. Il metodo utilizzato dipende dalla matrice.

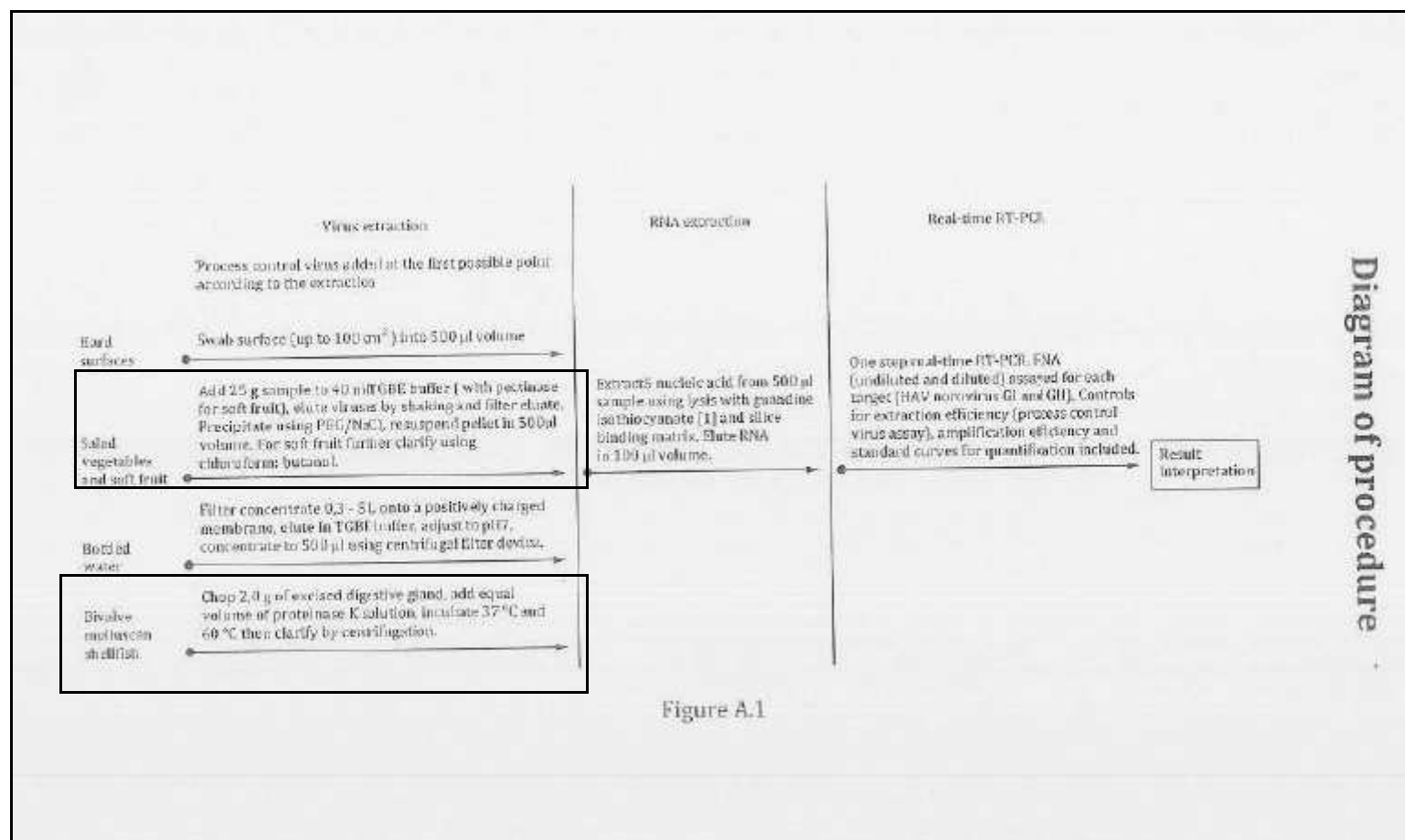
2. Estrazione RNA: il genoma virale deve essere purificato con un metodo che permetta di ottenere RNA con elevato grado di purezza e privo di inibitori della reazione di PCR.

3. Real-time RT-PCR: l'RNA ottenuto nel precedente passaggio viene utilizzato come template in una reazione di PCR real time preceduta da una retrotrascrizione dell'RNA in cDNA. La reazione avviene in un unico step: i reagenti per la retrotrascrizione e la PCR real time sono aggiunti al template in un unico tubo di reazione ed avvengono consecutivamente.

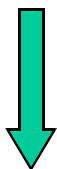
4. Analisi dei risultati: la presenza o assenza di curve di amplificazione si esprime come "Rilevata presenza" o "Non rilevata presenza" di genoma virale nella porzione di alimento analizzato.



Annex A



1. Estrazione del virus



Molluschi bivalvi

Prelievo dell'epatopancreas

*(ghiandola nella quale sono concentrati i virus
dalla filtrazione)*

Digestione con proteinasi K

Vegetali

Frutti di bosco

Lavaggio con buffer TGBE

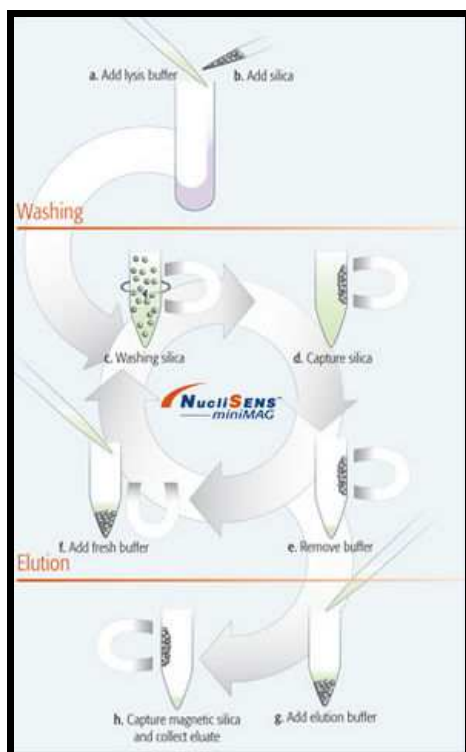
**Concentrazione virus con
PEG/glicina**





2. Estrazione RNA NucliSENS® MiniMag -bioMerieux

Tecnologia di BOOM: estrazione con la silice



- Durante l'incubazione dei campioni lisati, tutto l'acido nucleico target viene catturato dalle particelle di silice magnetica.
- Il dispositivo magnetico del NucliSENS MiniMAG attrae la silice magnetica, dando la possibilità di purificare gli acidi nucleici attraverso una fase di lavaggi ripetuti.
- La fase di riscaldamento (5' a 95°C) libera gli acidi nucleici dalla silice
- Nella fase finale, le particelle di silice magnetica vengono separate dall'eluato con l'utilizzo di un rack magnetico.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

3. Real-time RT-PCR (1): mix reazione

RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (ThermoFisher Scientific)

For amplification of RNA viruses and ultra-low abundance transcripts

Preparazione Mix di reazione:

RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix

RNA UltraSense™ 20X Enzyme Mix

Primer 1 (12,5 µM)

Primer 2 (22,5 µM)

Probe (6,5 µM)

Acqua fino a 20 µl totali



3. Real-time RT-PCR (2): controlli

Controllo di processo (CP): MENGO VIRUS

- ✓ Permette di determinare la quantità di virus recuperato/perso nelle fasi di estrazione/concentrazione del virus e purificazione degli acidi nucleici.
- ✓ Deve essere aggiunto all'inizio del processo di analisi.
- ✓ Dall'analisi dei dati relativi all'amplificazione del CP si calcola l'EFFICIENZA DI ESTRAZIONE per ogni campione.

Controllo esterno di amplificazione ad RNA (EC)

- ✓ Permette di verificare la presenza di eventuali inibitori della reazione di PCR
- ✓ Deve essere aggiunto ad ogni campione per ogni target analizzato e i risultati sono confrontati con quelli ottenuti in assenza di campione
- ✓ Dall'analisi dei dati relativi all'EC si calcola l'EFFICIENZA DI AMPLIFICAZIONE per ogni campione.



3. Real-time RT-PCR (3): analisi dei target

Per ogni campione allestire :

1 pozzetto con 5 μ l di RNA non diluito

1 pozzetto con 5 μ l di RNA diluito 1:10

1 pozzetto con 5 μ l di RNA non diluito + 1 μ l EC RNA

1 pozzetto con 5 μ l di RNA diluito 1:10 + 1 μ l EC RNA

Per il controllo positivo

1 pozzetto con 5 μ l di H₂O + 1 μ l EC RNA

Per i controlli negativi:

1 pozzetto con 5 μ l di H₂O (NTC)

1 pozzetto con 5 μ l di controllo negativo di estrazione



3. Real-time RT-PCR (4): analisi del controllo di processo (CP)

Per ogni campione allestire :

1 pozzetto con 5 μ l di RNA non diluito

1 pozzetto con 5 μ l di RNA diluito 1:10

Per la curva standard

1 pozzetto con 5 μ l di CP tal quale (non diluito)

1 pozzetto con 5 μ l di CP diluito 1:10

1 pozzetto con 5 μ l di CP diluito 1:100

1 pozzetto con 5 μ l di CP diluito 1:1000

Per i controlli negativi:

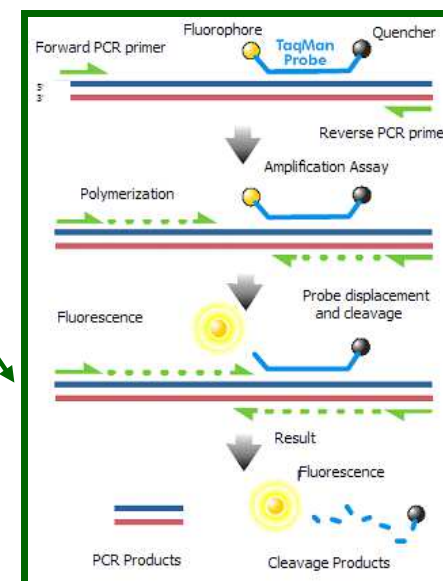
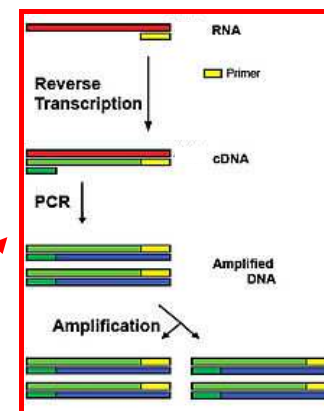
1 pozzetto con 5 μ l di H₂O (NTC)

1 pozzetto con 5 μ l di controllo negativo di estrazione



3. Real-time RT-PCR (5): profilo termico

Descrizione		Temp. e tempo	Num. cicli
Retrotrascrizione		55°C 1h	1
Preheating		95°C 5 min	1
Amplificazione	Denaturazione	95°C 15 sec	45
	Annealing- extention	60°C 1 min 65°C 1 min	

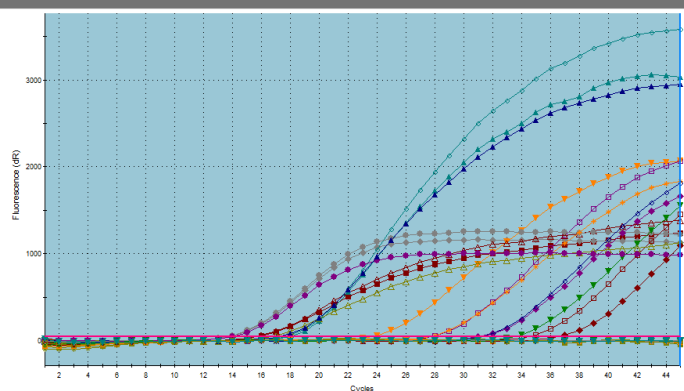




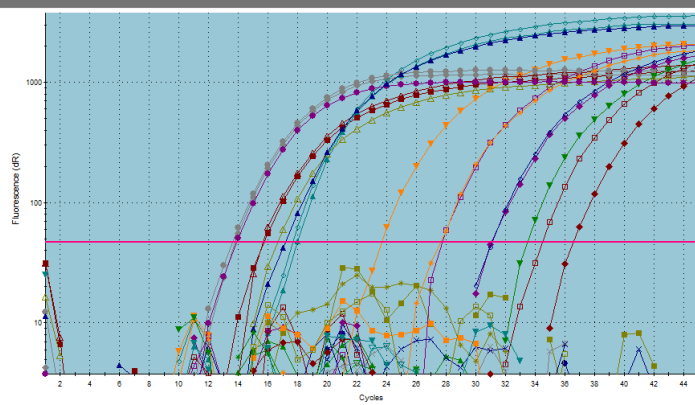
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

4. Analisi dei risultati (1):

Amplification Plots



Amplification Plots



All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown		Unknown		Standard		
	No Ct	15.75	No Ct	13.80	No Ct	17.98		27.76		23.67		
B	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown		Unknown		Standard		
	No Ct	15.68	No Ct	13.62	No Ct	17.98		31.06		27.64		
C										Standard		
										31.15		
D										Standard		
										34.50		
E												
F								Unknown				
								33.50				
G	Unknown	FAM Pos +	Unknown	FAM Pos +	Unknown	FAM Pos +		Unknown				
	No Ct	16.66	No Ct	13.90	No Ct	17.16		26.58				
H	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown		Unknown				
	No Ct		No Ct		No Ct			No Ct				

Well	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)	Quantity (copies)	RSq (dR)	Slope (dR)
A1	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
B1	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
G1	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
H1	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
A2	Unknown	46.902	15.75	5.660e-003	0.999	3.599
B2	Unknown	46.902	15.68	5.389e-003	0.999	3.599
G2	FAM Positive Control	46.902	16.66	1.009e-002	0.999	3.599
A3	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
B3	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
G3	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
H3	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
A4	Unknown	46.902	13.80	1.622e-003	0.999	3.599
B4	Unknown	46.902	13.62	1.443e-003	0.999	3.599
G4	FAM Positive Control	46.902	13.90	1.731e-003	0.999	3.599
A5	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
B5	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
G5	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
H5	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
A6	Unknown	46.902	17.69	1.951e-002	0.999	3.599
B6	Unknown	46.902	17.98	2.356e-002	0.999	3.599
G6	FAM Positive Control	46.902	17.16	1.394e-002	0.999	3.599
A8	Unknown	46.902	27.76	1.228e+001	0.999	3.599
B8	Unknown	46.902	31.06	1.017e+002	0.999	3.599
F8	Unknown	46.902	33.50	4.836e+002	0.999	3.599
G8	Unknown	46.902	36.58	3.478e+003	0.999	3.599
H8	Unknown	46.902	No Ct	No Ct	0.999	3.599
A10	Standard	46.902	23.67	0.00e+000	0.999	3.599
B10	Standard	46.902	27.64	1.00e+001	0.999	3.599
C10	Standard	46.902	31.13	1.00e+002	0.999	3.599
D10	Standard	46.902	34.50	1.00e+003	0.999	3.599



4. Analisi dei risultati (2): calcolo eff. amplificazione

$$\Delta Ct \left[Ct (\text{campione} + \text{EC RNA}) - Ct (\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNA}) \right] < 2$$



Nel caso in cui non sia < 2 prendere i valori di Ct relativi al campione dil.1:10

Se il nuovo ΔCt è < 2 dovranno essere considerati i valori del campione dil 1:10 anche per il calcolo dell'efficienza di estrazione.

Se il $Ct(\text{campione} + \text{EC RNA}) = Ct(\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNA}) \rightarrow$ L'efficienza di amplificazione è del 100%

Esempio: $Ct (\text{campione} + \text{EC RNAGI}) = 19,21$

$Ct (\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNAGI}) = 18,92$

$\Delta Ct = 19,21 - 18,92 = 0,29 \rightarrow$ Eff.amplificazione **ACCETTABILE**

NOTA: la presenza di inibenti nel campione può determinare una eff.di amplificazione **NON ACCETTABILE**. La diluizione campione può migliorare l'eff.di amplificazione grazie alla conseguente diluizione degli inibenti.





4. Analisi dei risultati (3): calcolo eff. estrazione

L'efficienza di estrazione si calcola sui valori di PCR ottenuti con i primers e sonde specifici per il Mengo virus (CP)

Eff. Estrazione accettabile: $\Delta Ct [Ct \text{ campione} - Ct \text{ CP tal quale}] < 6,64$

CP tal quale = 1° punto curva standard

Un valore di $\Delta Ct < 6,64$ determina una eff. di estrazione **>1%**.

Se il $Ct \text{ campione} = Ct \text{ CP tal quale}$ \rightarrow L'efficienza di estrazione è del 100%

Esempio:

$Ct \text{ campione} = 30,34$

$Ct \text{ CP tal quale} = 25,77$

$\Delta Ct = 30,34 - 25,77 = 4,57$

\rightarrow Eff. estrazione **>1% ACCETTABILE**

NOTA: l'efficienza di estrazione è fortemente influenzata dalla natura della matrice.

L'epatopancreas dei molluschi bivalve non correttamente prelevato può presentare residui di tessuti mucillaginosi o grassi che imbrigliano il mengo virus aggiunto come controllo di processo e ne diminuiscono il recupero finale.





4. *Analisi dei risultati (4):*

Attenzione: in caso di campione positivo (presenza di una curva di amplificazione) ad uno o più dei target ricercati (Norovirus GI, GII o epatite A) l'efficienza di amplificazione e l'efficienza di estrazione non sono influenti, anche nel caso in cui non diano valori accettabili.

Il campione è comunque POSITIVO.



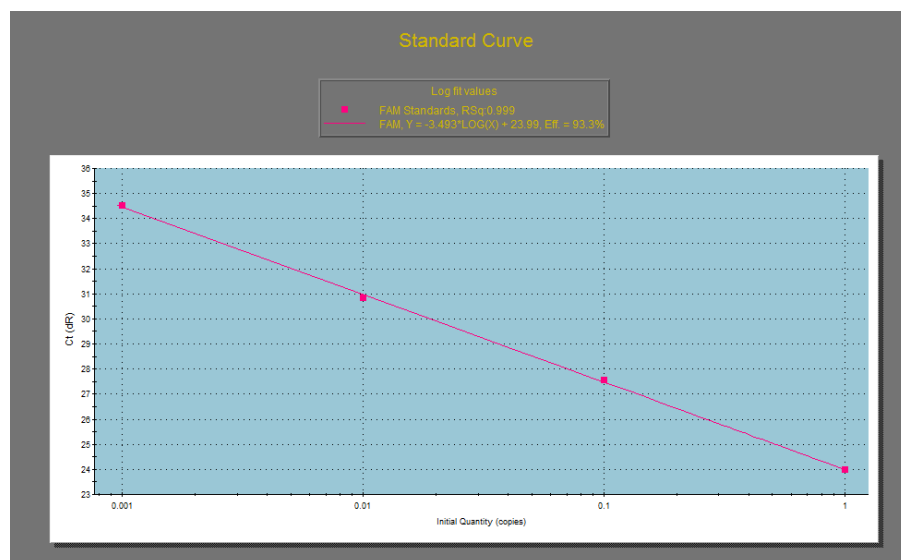
4. Analisi dei risultati (5):

Curva standard: deve essere costituita da almeno 4 punti

- 1° punto: CP tal quale
- 2° punto: CP dil 1:10
- 3° point: CP dil 1:100
- 4° punto: CP dil 1:1000

Se un punto cade fuori dalla linea di "best fit"
non deve essere considerato
Tuttavia devono essere considerati almeno
3 punti.

Non possono essere accettate curve con un
coefficiente di Pearson (r^2) inferiore a 0,98



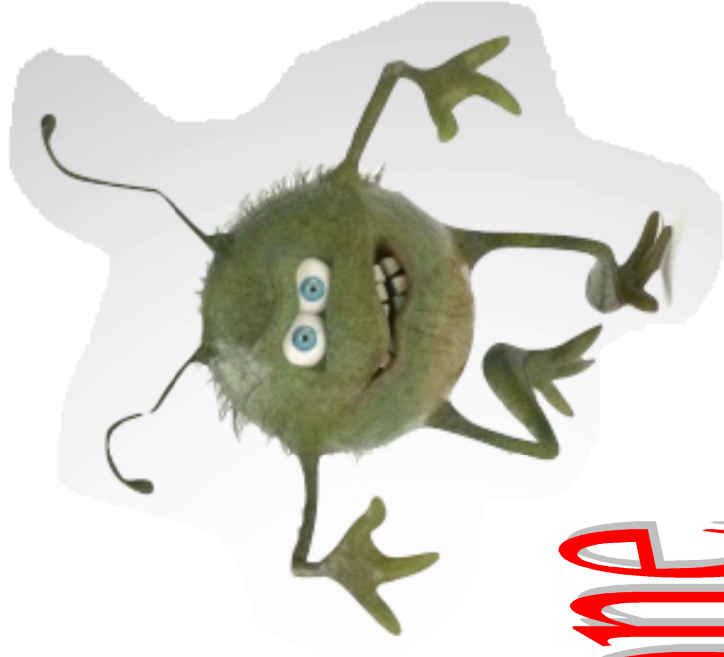
Espressione dei risultati

- “Rilevata presenza” o “Non rilevata presenza”
del genoma virale ricercato
oppure “Inconclusivo” qualora una delle due efficienze
calcolate non sia accettabile.
- Quantità di alimento su cui si è effettuata l’analisi
(es. 2gr di tessuto epatopancreatico o 25gr di frutti di bosco)
- tLOD e pLOD
- Efficienza di estrazione (maggiore o inferiore all’1%)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Grazie dell'attenzione

