Inattivazione e stabilizzazione genomica del virus della Peste suina africana e della Peste suina classica mediante PrimeStore® MTM

A. Fulmini[1], A. Felici[2], C. Casciari[1], G. Costantino[1], M. Pela[1], F. Feliziani[1], M.S. Beato[1]

1Centro di Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da *Pestivirus* e da *Asfivirus* (CEREP),

[2]Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM)

INTRODUZIONE

Background. L'elevata persistenza ambientale dei virus della Peste suina africana (PSA) e della Peste suina classica (PSC) rende cruciale l'adozione di protocolli di campionamento e inattivazione sicuri.

Stato dell'arte. È noto che PrimeStore® Molecular Transport Medium (MTM) inattiva e stabilizza entrambi i patogeni a +4 °C e temperatura ambiente per 21 giorni(1) e 60 giorni(2), rispettivamente.

Gap scientifico. L'efficacia di PrimeStore® MTM nel preservare gli acidi nucleici non è mai stata testata alla temperatura controllata di +22 °C né in condizioni di elevato stress termico, a +37 °C.

Obiettivo. Questo studio valuta per la prima volta l'efficacia di PrimeStore® MTM nel preservare gli acidi nucleici a +22 °C e +37 °C per 15 giorni.

MATERIALI E METODI

Per lo studio di inattivazione della PSA è stato utilizzato come ceppo di riferimento il virus BA71V, genotipo I, adattato in laboratorio ($10^{6.5}$ $TCID_{50}$/50 µl), mentre per la PSC sono stati utilizzati i ceppi Alfort/187 ($10^{6.0}$ $TCID_{50}$/50 µl) e CSF104 ($10^{4.25}$ $TCID_{50}$/50 µl). Le sospensioni virali sono state incubate per 30 minuti con MTM, in rapporto 1:3 (v/v), a tre diverse temperature (+4, +22 e +37 °C), come illustrato in Figura 1.

L'inattivazione del virus della PSA è stata valutata mediante isolamento virale su linea cellulare continua VERO, monitorando la presenza o l'assenza di effetto citopatico (CPE). Quella del virus della PSC è stata testata su cellule PK-15, e la replicazione virale è stata analizzata mediante saggio di immunofluorescenza. Tutti i campioni sono stati filtrati utilizzando filtri centrifughi Amicon Ultra 0,5 ml, 50 kDa(3), al fine di rimuovere la citotossicità residua.

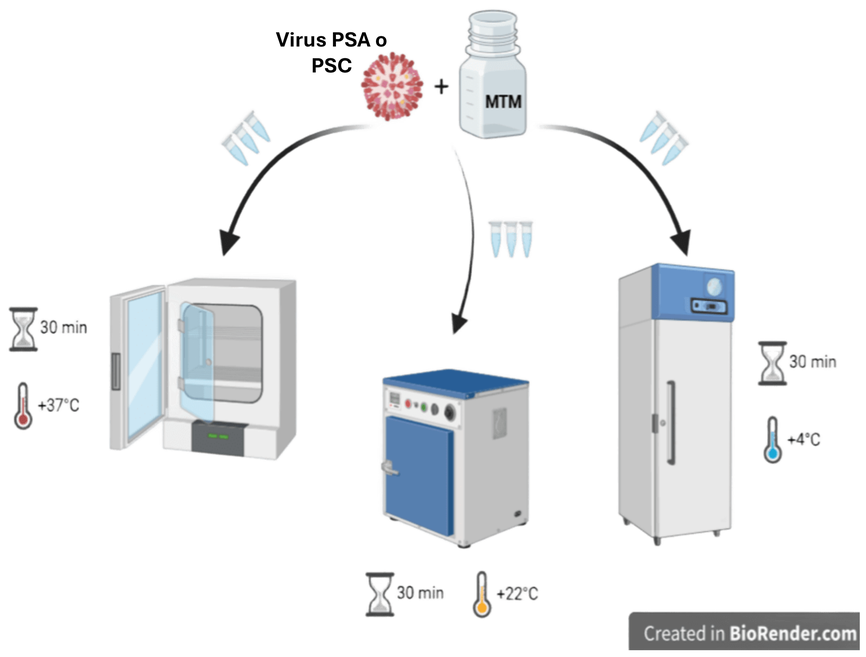

Figura 1. Protocollo di inattivazione virale con PrimeStore® MTM.

La stabilità degli acidi nucleici virali è stata valutata dopo 30 minuti, 7 giorni e 15 giorni, mediante estrazione automatizzata [MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit] e Real-Time PCR, secondo i protocolli raccomandati dalla WOAH(4,5), sia per i virus non trattati sia per quelli trattati con PrimeStore® MTM. Per ciascun campione sono state preparate tre repliche tecniche.

RISULTATI

Inattivazione virale

- I virus testati sono risultati inattivati dopo 30 minuti di esposizione, indipendentemente dalla temperatura di incubazione;
- I filtri Amicon hanno rimosso efficacemente la citotossicità indotta dal PrimeStore® MTM nelle colture cellulari VERO e PK-15.

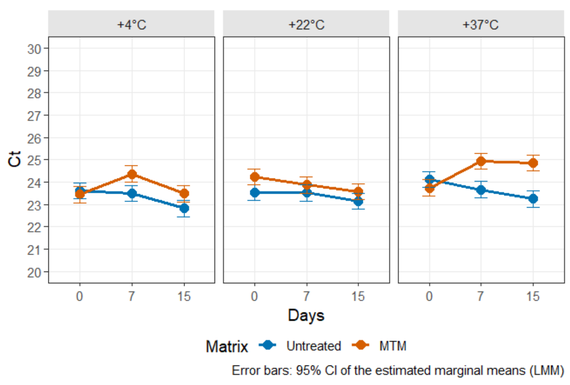

Figura 2. Grafico sull'andamento nel tempo dei valori medi di Ct del virus della PSA in relazione a temperatura e matrice.

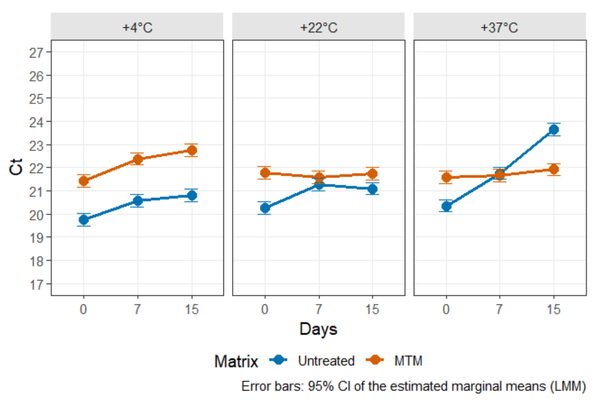

Figura 3. Grafico sull'andamento nel tempo dei valori medi di Ct del virus della PSC in relazione a temperatura e matrice.

Stabilizzazione del DNA ed RNA virale

- Per il virus della PSA, nei campioni trattati con PrimeStore® MTM è stata osservata una maggiore variabilità e una risposta più marcata dipendente dalla temperatura, in particolare a +37 °C (Figura 2), rispetto ai campioni non trattati;
- Il virus della PSC trattato con PrimeStore® MTM ha mostrato stabilità termica e temporale, con variazioni di Ct non significative a +22 °C e +37 °C e solo un lieve aumento a 15 giorni a +4 °C (Figura 3).

DISCUSSIONE

Standardizzazione termica. Per superare l'ambiguità del termine "temperatura ambiente" riportato in letteratura, questo studio ha testato in modo rigoroso e riproducibile le condizioni di **+22 °C** e di maggiore stress termico a **+37 °C** utilizzando PrimeStore® MTM sui virus della PSA e della PSC.

Riproducibilità e variabilità tecnica. L'impiego di tre repliche tecniche ha garantito un'elevata affidabilità, evidenziando una minima variabilità analitica.

Stabilità del DNA (PSA). Sebbene siano state rilevate piccole variazioni statisticamente significative (**0,6–1,2 Ct**), queste risultano ampiamente inferiori alla soglia di **3,3 Ct** (equivalente a una riduzione di 1 log), indicando un **impatto biologico trascurabile** sulla stabilità degli acidi nucleici.

Stabilità dell'RNA (PSC). L'effetto stabilizzante è stato particolarmente evidente a **+37 °C per 15 giorni**, indicando l'efficacia nel preservare campioni positivi.

Prospettive. Per confermare la robustezza complessiva del sistema, i prossimi sviluppi prevedono l'introduzione di repliche biologiche distinte per stimare la variabilità inter-campione.

BIBLIOGRAFIA

1. Rempel J, et al. Safe and efficient transportation of clinical samples for molecular detection of African swine fever virus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2025;15:1630865. doi: 10.3389/fcimb.2025.1630865.
2. Muñoz-Aguilera A, et al. Efficient Biosafe Inactivation of Classical Swine Fever Virus While Preserving Viral RNA for Molecular Diagnosis. Viruses. 2026;18(8):885. doi: 10.3390/v18080885. PMID: 42655702; PMCID: PMC13517193.
3. Welch S.R, et al. Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *J Clin Microbiol*. 2020;58(11):e01713-20. doi: 10.1128/JCM.01713-20.
4. King D.P, et al. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*. 2003 ;107(1):53-61. doi: 10.1016/s0166-0934(02)00189-1.
5. Hoffmann B, et al. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods*. 2005;130(1-2):36-44. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.030.