

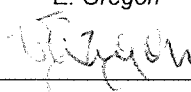
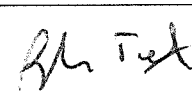
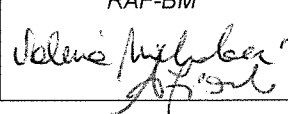
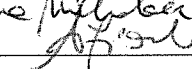


DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.012

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 2

Edizione/Rev.	In vigore il: RAQ-SP	Redazione RSA-2-BM	Verifica RSA-2-BM sost RAF-BM sost	Approvazione DR-ZA
00/0	R. Borroni 14.01.2015	R. Tozzoli	S. Morabito L. Morelli	A. Caprioli
00/1	R. Borroni 20.09.2016	R. Tozzoli	S. Morabito L. Morelli	DR-ZA-Sost. S. Morabito
01/0	26.10.2017 R. Borroni	R. Tozzoli	A. Maugliani L. Morelli	UDA-BM S. Morabito
01/1	04.07.2019 E. Gregori	R. Tozzoli	RSA-2-BM sost RAF-BM A. Maugliani A. Fiore	UDA-BM S. Morabito
01/2	26/02/2021 E. Gregori 		RSA-2-BM sost. / RAF-BM  	UDA-BM 

Descrizione delle modifiche:

In tutto il documento: correzione dei refusi; **Par. 6:** descrizione della suddivisione in aree del laboratorio in risposta al rilievo 8 di 15 da audit interno area BM del 4.12.2020; **Par.6.1:** inserimento delle modalità di conservazione dei campioni all'arrivo e durante l'analisi in risposta al rilievo 10 di 15 da audit interno area BM del 4.12.2020; **Par.6.3:** inserimento specifiche per l'utilizzo della MyRed Taq.

☐ Copia controllata n° _____

☐ Copia non controllata

	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE	3
2. RIFERIMENTI NORMATIVI	3
3. DEFINIZIONI	4
4. ABBREVIAZIONI	5
5. RESPONSABILITÀ	6
6. DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA	6
6.1 Preparazione del campione	7
6.2 Preparazione del DNA stampo per la reazione di PCR	9
6.3 Allestimento delle reazioni di amplificazione	10
6.4 Elettroforesi orizzontale su gel di agarosio	12
6.5 Attrezzature ed apparecchiature	12
6.6 Reagenti	13
6.7 Sicurezza e d.p.i.	14
6.8 Ceppi di riferimento	14
6.9 Interpretazione dei risultati	15
6.10 Controllo di qualità interno	16
6.11 Riesame della validazione	16
7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA	16
8. DESTINATARI	17
Appendice 1. Condizioni per l'amplificazione e sequenze dei primers	18
Appendice 2. Preparazione dei reagenti	18

	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

I ceppi di *E. coli* VTEC, patogeni per l'uomo, possiedono geni codificanti la verocitotossina (VT) di tipo I e/o di tipo II e producono la tossina stessa; la maggior parte di questi, possiede inoltre il gene *eae* che codifica il fattore di adesione intimina, responsabile dell'effetto di "attaching/effacing". (Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 2005 36: 289-311).

Lo scopo del metodo di prova è di accertare per amplificazione enzimatica in vitro (PCR) la presenza dei geni codificanti le Verocitossine (VT1, VT2 nelle varianti VT2a e VT2c) in campioni di prova costituiti da colture di *E. coli*. Il presente metodo, viene applicato a colture batteriche miste, a ceppi isolati e a campioni di feci umane o animali inviati al laboratorio per identificare la presenza di VTEC. Le differenti tipologie di campioni di prova e i relativi trattamenti sono elencati in dettaglio al punto 6.1.

2. RIFERIMENTI

- ISO 6887, Microbiology of food and animal feeding stuff - General guidance for the preparation of test samples, initial suspension and dilutions for microbiological examinations.
- ISO 7218/Amd1:2013 "Microbiology of food and animal feeding stuffs –General requirement and guidance for microbiological examinations" - Corrected version:2014.
- EN ISO 22174 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions.
- ISO/TS 20836 Microbiology of food and animal feeding stuffs-PCR for the detection of food-borne pathogens-Performance testing for thermal cyclers.
- Direttiva 2003/99/CE, Misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

- Decreto Legislativo 3 agosto 2009, n. 106 Disposizioni integrative e correttive del *decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro*. (09G0119) (GU n. 180 del 5-8-2009 - Suppl. Ordinario n. 142)
- “Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media” - ISO 11133:2014/Amd.1:2018
- POVDBM01 “Validazione metodi biologia molecolare”
- POMRBM01 “Gestione Materiali di riferimento”
- PGGMSP01 “Gestione Materiali e Reagenti”
- POQMSP01 “Controllo di qualità interno”
- PGCPSP01 “Gestione campione e pratiche”
- PGGDSP01 “Gestione della documentazione”
- PGRMSP01 “Redazione metodi di prova”
- PGGASP01 “Gestione delle apparecchiature”
- POMRBM01 “Gestione materiali di riferimento”
- PGVDSP01 “Validazione metodi di prova”
- POQTBM01 “Preparazione, sterilizzazione e controllo di qualità di terreni e dei materiali destinati alla microbiologia”

3. DEFINIZIONI

- Per le definizioni generiche riguardanti la metodica PCR si rimanda alla EN ISO 22174 “Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions”.
- Campione: Campione di prova.
- ID campione: Codice identificativo del campione, come codificato dalla procedura “Gestione campione e pratiche” PGCPSP01.

	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1

4. ABBREVIAZIONI

AN	Acido Nucleico
BM	Biologia molecolare e Microbiologia (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)
CB	Colture Batteriche
DD	Direttore di Dipartimento
DR	Direttore del Reparto
FE	Feci
ISS	Istituto Superiore di Sanità
LNR	Laboratorio Nazionale di Riferimento
PCR	Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi)
PTP	Personale tecnico abilitato all'esecuzione di attività di prova
RAF	Referente Area Funzionale
RAQ	Responsabile Assicurazione Qualità
RSA-2-BM	Responsabile Settore Analitico LNR/ EU-RL <i>E. coli</i>
SGQ	Sistema gestione della qualità
SP	Dipartimento "Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria."; solo nella codifica dei documenti e nella codifica delle funzioni
TA	Tampone
TSB	Tryptone soy broth
VT	Verocitotossina
VT1	Verocitotossina di tipo 1
VT2	Verocitotossina di tipo 2
VTEC	<i>E. coli</i> produttori di Verocitotossina
SM	Reparto Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare – One Health MTA (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)
<i>vtx</i>	gene codificante le VT, sinonimo anche di <i>stx</i>

5. RESPONSABILITÀ

	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1

L'esecuzione del presente metodo, la verifica dell'idoneità del campione, la registrazione delle operazioni e dei dati grezzi sono responsabilità del PTP-BM. Mentre la responsabilità della convalida dei risultati, delle osservazioni e dei calcoli sono dell'RSA-2-BM e del DR- SM.

E' responsabilità del RAF-BM garantire in particolare che i flussi dei processi che rientrano nell'ambito di applicazione del SGQ siano conformi alla presente procedura.

6. DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA

Il metodo è basato sul principio dell'amplificazione specifica di una sequenza di DNA a partire da oligonucleotidi di sintesi complementari alle estremità della sequenza stessa, che funzionano da innesco per una reazione di polimerizzazione in vitro per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR).

La ricerca dei geni codificanti le VT, definiti *vtx* o *stx*, viene eseguita utilizzando la metodica dell'amplificazione in vitro del DNA (PCR) utilizzando primers specifici per i geni codificanti ciascun tipo di verocitotossina: KS7/KS8 per *vtx1/stx1* e GK3/GK4 per *vtx2/stx2* (Appendice 1).

La metodica si articola in quattro fasi principali successive:

- Preparazione del campione (sez. 6.1)
- Preparazione del DNA stampo da utilizzare per la reazione di PCR (sez. 6.2)
- Allestimento delle reazioni di amplificazione (sez. 6.3)
- Visualizzazione del risultato per elettroforesi orizzontale su gel di agarosio (sez. 6.4)

Il laboratorio è suddiviso in due aree, separate da un divisorio: la prima più interna è adibita alla Microbiologia, mentre la seconda, più esterna, è dedicata alla Biologia molecolare. Le prime due fasi della procedura, descritte nelle sez. 6.1 e 6.2, vengono eseguite nell'area del laboratorio adibita per la Microbiologia, dove sono collocate cappa a flusso laminare "Biohazard", frigo-congelatore campioni e incubatori. Le altre due fasi, descritte nelle sezioni 6.3 e 6.4 della procedura, vengono



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

effettuate nell'area di Biologia molecolare dove è collocata una cappa per Biologia Molecolare utilizzata per l'allestimento delle reazioni di PCR.

6.1 Preparazione del campione

Per le fasi della preparazione del campione viene utilizzato il modulo IOFLBM01.I36n.

- Criteri di conformità dei campioni

La verifica di conformità dei campioni viene effettuata al momento dell'apertura del conferimento come indicato nella Procedura generale "Gestioni campioni e pratiche" PGCPSP01.

Nel caso di campioni refrigerati, la temperatura, rilevata all'interno del contenitore con termometro certificato, deve essere compresa tra +2.0°C e +8.0°C. Per i campioni congelati, la presenza del ghiaccio secco o siberini congelati nel contenitore, insieme alla verifica dello stato solido del campione, è un'indicazione sufficiente per determinarne la conformità. I campioni di prova spediti a temperatura ambiente non sono sottoposti al controllo della temperatura.

I campioni non conformi per i requisiti sopra citati, sono comunque sottoposti ad analisi, in virtù della rilevanza epidemiologica dell'evento a cui sono associati.

- Conservazione dei campioni all'arrivo e durante l'analisi

I campioni di feci, sieri e acido nucleico vengono conservati in attesa delle analisi in congelatore (<-15°C) se arrivati congelati o in frigorifero (+2.0°C e +8.0°C) se spediti refrigerati. Nel caso in cui sieri e feci arrivassero a temperatura ambiente, in seguito all'apertura del conferimento vengono conservati nel frigorifero (+2.0°C e +8.0°C). A seconda della loro natura, i ceppi e le colture batteriche vengono conservati a temperatura ambiente se inviati come iniezioni in agar molle o becchi di clarino, mentre nel reparto frigorifero (+2.0°C e +8.0°C) adibito alla conservazione dei campioni se conferiti come strisci su piastre. Ceppi e colture batteriche vengono messe nel congelatore (<-15°C) qualora arrivino come sospensioni in "criobanks" o in contenitori contenenti altri criopreservanti.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

Durante l'analisi, tutti i campioni vengono conservati nel frigorifero (+2.0°C e +8.0°C). Fanno eccezione i ceppi e le colture batteriche inviati come infissioni in agar molle o becchi di clarino, che continuano a essere mantenuti a temperatura ambiente, e i ceppi e le colture batteriche conferite come sospensioni in "criobanks" o con altri criopreservanti che una volta seminati vengono conservati nel congelatore (<-15°C).

6.1.1 Campioni fecali

All'arrivo in laboratorio, il campione viene aperto in asepsi e un'aliquota corrispondente alla quantità prelevata con un'ansa monouso da 10 µl viene seminata ad isolamento direttamente su terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey. Nel caso di campioni clinici da casi di patologia, potenzialmente trattati con antibiotici, una aliquota di campione fecale viene contemporaneamente inoculata in brodo nutriente (TSB) ad una diluizione 1:500-1:1000 volume/volume al fine di consentire la crescita di eventuali VTEC presenti ma mantenuti in condizioni di stress. Le piastre e le colture liquide sono poi incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h. Qualora sulla piastra seminata direttamente non si sviluppino colonie con morfologia compatibile con *E. coli* ma si osservi crescita nella coltura liquida, 10 µl di questa vengono seminati su terreno di McConkey agarizzato. Le piastre sono poi incubate a 37 ± 1 °C per ulteriori 18-24 h.

Le piastre su cui si ha sviluppo di colonie con morfologia compatibile con *E. coli* vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.2).

6.1.2 Colture batteriche

Sospensioni in "Criobanks" o altri crio-preservanti.

Prelevare in asepsi una perlina dalla provetta utilizzando un ago da infissione sterile e inoculare in 2 ml di terreno nutriente (TSB) in tubo per batteriologia. L'inoculo è incubato a 37 ± 1 °C per 18-24 h. In seguito all'incubazione 10 µl del brodo di arricchimento vengono seminati su terreno di McConkey agarizzato o,



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1
---------------	---	--------

in alternativa, il Sorbitol McConkey. Le piastre sono poi incubate a 37 ± 1 °C per ulteriori 18-24 h. A questo punto le piastre vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.2).

Infissioni in agar molle, strisci su piastre o “becchi di clarino”.

Prelevare il campione in asepsi con un’ansa da 1 µl e seminarlo ad isolamento direttamente su terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey. Incubare le piastre a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le piastre vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte in seguito.

Piastre di primo isolamento:

Questo tipo di matrice è immessa direttamente nel flusso delle operazioni previste di seguito (8.2).

6.1.3 Tamponi di prelievo in terreno di trasporto (feci o colture batteriche)

Prelevare il tampone in asepsi e inocularlo in 9 ml di terreno nutriente (TSB) in tubo per batteriologia. L’inoculo è incubato a 37 ± 1 °C per 18-24 h. In seguito all’incubazione, 10 µl del brodo di arricchimento vengono seminati ad isolamento su terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey. Le piastre sono poi incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le piastre vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.2).

6.2 Preparazione del DNA stampo per la reazione di PCR

Le piastre di terreno agarizzato vengono utilizzate nel modo seguente:

- Prelevare, dalla zona di maggior crescita sulla piastra (zona di scarico), la patina batterica con un’ansa monouso da 1 µl. Per ciascun campione, prelevare la patina da tre aree diverse della zona di scarico. Per i ceppi isolati è sufficiente una sola area di scarico.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

- Stemperare la patina prelevata in 200 µl di acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti. Per ciascun prelievo allestire una reazione di preparazione dello stampo separata e marcata con la dicitura scarico 1; scarico 2; scarico 3.

In caso di positività del campione alla PCR sulla zona di scarico delle piastre, stemperare 5 colonie batteriche isolate separatamente in altrettanti tubi come descritto sopra e sottoporle al saggio PCR. Se non fossero presenti colonie isolate a sufficienza sulla piastra, procedere al re-isolamento dalla zona di scarico su una nuova piastra di terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey (sez. 6.6) e ripetere la procedura per la preparazione dello stampo sul numero di colonie stabilito. Qualora non siano riscontrate positività nelle colonie isolate, prelevare altre 5 colonie e ripetere il saggio. Questo passaggio viene ripetuto per un massimo di 15 colonie isolate saggiate in totale.

Per i ceppi isolati positivi alla reazione di PCR vengono saggiate 5 colonie.

Nel caso in cui i campioni siano stati precedentemente analizzati con il metodo di screening in Real Time PCR (LNRVTEC29) e risultati positivi per *vtx1* e/o *vtx2*, questo metodo viene applicato solo alle summenzionate 15 colonie isolate, e vengono saggiati solo per i geni risultati positivi al metodo di screening in real time PCR. Nel foglio di lavoro IOFLBM01.I36n verrà pertanto compilata solo la sezione nella quale si fa riferimento alle colonie prelevate e sbarrate quelle con riferimento agli scarichi.

6.3 Allestimento delle reazioni di amplificazione

Le reazioni vengono allestite in 50 µl totali per ciascun campione e sono composte da: Tampone di reazione alla concentrazione finale di 1X (viene fornito dal produttore della Taq polymerase alla concentrazione di 10X; per ottenere una concentrazione 1X si aggiungono 5 µl di tampone 10X nel volume finale di 50 µl); MgCl₂ alla concentrazione finale di 1,5 mM, una miscela dei quattro deossiribonucleotidi alla concentrazione finale di 0,2 mM ciascuno; 50 picomoli di ciascun primer, 1 unità di enzima Taq polymerase e 10 µl di DNA stampo. Il volume viene aggiustato a 50 µl con acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti.



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

Viene allestita una miscela di reazione unica preparata tenendo conto del numero totale dei campioni da saggiare ma sottraendo il volume del DNA stampo e aggiungendo nell'ordine: Acqua, Tampone di reazione, $MgCl_2$, la miscela dei quattro deossiribonucleotidi, i primers e infine la Taq polymerase.

In alternativa per l'allestimento delle reazioni di PCR si può utilizzare una Mastermix contenente tutti i componenti necessari per la reazione a cui aggiungere solo i primers, il DNA stampo e acqua. Se si utilizza la Mastermix MyTaq Red 2X, che contiene, oltre ai componenti ottimizzati per le reazioni di PCR, anche il colorante per il successivo caricamento su gel, si diluisce la Mastermix in maniera tale da ottenere una soluzione 1X in 50 μ l, ovvero aggiungere a 25 μ l di Mastermix 2X la coppia di primer e acqua fino a 40 μ l, cui verranno successivamente aggiunti 10 μ l di DNA stampo. La miscela di reazione viene preparata utilizzando il foglio di lavoro IOFLBM01.I37n. nel caso venga utilizzata una Taq polimerasi che richiede l'aggiunta dei componenti $MgCl_2$ e dNTPs e il foglio di lavoro IOFLBM01.I40n. nel caso venga utilizzata la Mastermix MyTaq Red 2X. Infine, 40 μ l della miscela così ottenuta vengono distribuiti in microprovette da 0,2 ml ed aggiunti 10 μ l di DNA stampo.

Tutte le fasi dell'allestimento delle miscele di reazione vengono condotte sotto cappa a flusso per PCR.

La miscela di reazione deve essere allestita considerando sempre, oltre al numero dei campioni, un controllo positivo costituito da un ceppo di *E. coli* contenente i geni di virulenza (punto 6.8) e due controlli negativi: uno costituito da un ceppo di *E. coli* di laboratorio privo dei geni di virulenza considerati ed uno costituito da un campione in cui non è aggiunto alcun DNA stampo.

Le reazioni vengono a questo punto incubate in un termociclatore e viene impostato un programma di temperature specifico per i geni da amplificare (Appendice 1).

6.4 Elettroforesi orizzontale su gel di agarosio

Per la visualizzazione dei prodotti di amplificazione, 15 μ l della miscela di reazione vengono addizionati di un tampone di caricamento (Appendice 2) contenente un colorante in ragione di un sesto del volume



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

totale; questi vengono quindi caricati su un gel di agarosio al 1 - 1,5 % in tampone tris acetato EDTA alla concentrazione di 1X (Appendice 2) e sottoposti ad elettroforesi in campo elettrico costante con voltaggio di 100 V. L'ordine di caricamento del gel segue lo schema di PCR cui fa riferimento, modulo IOFLBM01.I37n dopo l'ultimo controllo negativo viene caricato il marcatore di peso molecolare (100 bp o 1Kb).

L'elettroforesi su gel di agarosio permette la visualizzazione del DNA grazie all'utilizzo del bromuro di etidio che si intercala tra le coppie di basi dei frammenti di DNA. Questo, se eccitato da luce ad una lunghezza d'onda che cade nell'ultravioletto, emette fluorescenza visibile. Il bromuro di etidio deve essere utilizzato alla concentrazione di 0,5 µg/ml. La corsa elettroforetica viene visualizzata sul transilluminatore e l'immagine acquisita mediante l'apparecchiatura fotografica viene stampata e allegata al relativo foglio di lavoro IOFLBM01.I37n.

6.5 Attrezzature ed apparecchiature

- Cappa a flusso laminare
- Cappa a flusso laminare per PCR
- Anse da batteriologia monouso da 1 e 10 µl
- Tubi con tappo a scatto da 15 ml
- Beute da 500 ml
- Cilindri da 500 ml
- Cilindri da un l
- Piastre per batteriologia
- Termostato a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Frigo-congelatore
- Bilancia tecnica adatta a pesate nell'intervallo 0,5-100 g
- Pipettatrici automatiche a volume variabile (P10, P20, P100, P200, P1000)



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

- Puntali sterili con filtro anti-aerosol
- Provette tipo Eppendorf da 1,5 ml
- Provette da 0,2 ml o piastrine da 96 pozzetti per PCR
- Piastra riscaldante
- Agitatore rotante
- Ancoretta magnetica
- Termociclatore (non sono richieste specifiche particolari)
- Apparato per elettroforesi orizzontale, Transilluminatore U.V.
- Apparecchiatura fotografica

6.6 Reagenti

Per la preparazione dei reagenti non acquistati già pronti si rimanda all'Appendice 2.

- Acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti
- Deossiribonucleotidi in soluzione stock 10 mM
- Oligonucleotidi sintetici in soluzione (50 pmoli/μl in acqua)
- Taq DNA polimerasi + tampone di reazione
- Tampone Tris Acetato EDTA
- Tampone di caricamento (acquistato pronto all'uso)
- Gel d'agarosio (per biologia molecolare)
- Etidio bromuro (acquistato pronto all'uso)
- Terreno TSB (acquistato pronto all'uso)
- Terreno McConkey-agar (piastre di terreno agarizzato; acquistate pronte all'uso)
- Terreno Sorbitol-McConkey-agar (piastre di terreno agarizzato; acquistate pronte all'uso)



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

6.7 Sicurezza e d.p.i.

E. coli O157:H7 ha una dose infettante molto bassa e sono segnalati casi di infezione contratta in laboratorio; è perciò necessario il rigoroso rispetto delle buone pratiche di laboratorio in tutte le fasi della procedura.

Inoltre gli isolati di *E.coli* produttori di verocitotossina sono inseriti nell'allegato XLVI del D. Lgs. 9 Aprile 2008, n. 81 - Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro (aggiornato settembre 2010 come patogeni appartenenti alla classe di rischio 3**), pertanto nel manipolare colture pure è raccomandato l'uso dei dispositivi di contenimento previsti dall'allegato XLVII della suindicata normativa e di protezione individuali quali camice e guanti in lattice monouso.

Il bromuro di etidio utilizzato per la colorazione dei gel di agarosio è una molecola aromatica ad azione intercalante tra le basi del DNA, pertanto è una sostanza mutagena, inoltre è tossico e pertanto deve essere utilizzato nelle condizioni previste dalla scheda di sicurezza allegata al prodotto al momento dell'acquisto.

L'utilizzo del transilluminatore a luce ultravioletta può essere dannoso per gli occhi, pertanto è indispensabile utilizzare D.P.I. quali occhiali o schermi in plexiglass.

6.8 Ceppi di riferimento

Come controllo positivo per l'amplificazione di tutti i geni di virulenza è utilizzato lo stipite di riferimento C210-03 con genotipo *eae+*; *vtx1+*; *vtx2+*.

Gli stipiti di riferimento sono gestiti in qualità come descritto nella POMRBM01 "Gestione Materiali di riferimento".

Come controllo negativo per l'amplificazione è utilizzato lo stipite di *E. coli* K12 MG1655 sprovvisto di tutti i geni di virulenza considerati.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

I controlli PCR vengono preparati come descritto nella sezione 6.2 “Preparazione dello stampo per la reazione di PCR” in 0,5 ml totale. Lo stampo così preparato viene assegnato di un numero di lotto e conservato in opportune aliquote a -20 °C, gestite secondo la PGGMSP01 “Gestione Materiali e Reagenti”. Le aliquote così preparate hanno una scadenza di un anno.

6.9 Interpretazione ed espressione dei risultati

Per la conferma dell'identità del prodotto di amplificazione, è stato fatto uno studio sull'analisi dell'omologia delle sequenze dei primers utilizzati in questo metodo valutata contro il database di sequenze mantenuto presso l'ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Inoltre, dai dati ottenuti comparando i risultati dell'applicazione di questo metodo a campioni clinici e a ceppi isolati con quelli ottenuti applicando agli stessi campioni il metodo di valutazione dell'effetto citopatico su monostrato di cellule Vero, è stata stabilita la concordanza tra la presenza del prodotto di amplificazione e la produzione di Verocitotossina. Infine, dati di sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione hanno consentito di stabilirne l'identità come sequenze dei geni codificanti le verocitotossine.

Pertanto, i campioni che presentano all'esame visivo delle corse elettroforetiche prodotti di amplificazione delle dimensioni attese sono da considerare positivi per la presenza di VTEC.

Il requisito della presenza di analoghe bande nei controlli positivi e di assenza nei controlli negativi è considerato come caratteristica irrinunciabile per la corretta valutazione del risultato e deve pertanto essere sempre soddisfatto.

In caso di assenza delle bande attese nel controllo positivo o di contaminazione dei controlli negativi è necessario ripetere la reazione di amplificazione.

Il risultato viene riportato sul rapporto di prova nel modo seguente: “assenza VTEC” o “presenza VTEC <Genotipo *vtx*>”.



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

6.10 Controllo di qualità interno

I risultati dei controlli aggiunti ad ogni sessione di lavoro sono riportati nella Carta di controllo di qualità interno per i metodi qualitativi POQMSP01, al fine di determinare il trend dei risultati del laboratorio ed intraprendere, se necessario, azioni preventive per consentire il miglioramento delle performances. Le carte di controllo riportano i risultati dei controlli in ordinata e in ascissa il riferimento o la data di applicazione del metodo. Ad ogni ciclo analitico quindi nella carta di controllo vengono riportati i risultati: con +1 quelli corretti (sia per il controllo positivo che per quello negativo) e come -1 quelli errati (nel caso in cui uno o entrambi i controlli non abbiano dato il risultato atteso).

6.11 Riesame della validazione

Annualmente il laboratorio procede ad un riesame della validazione del metodi di prova, secondo quanto prescritto dalla procedura generale “Validazione metodi di prova” PGVDSP01. Ove possibile nel riesame sono tenuti in considerazione i risultati di sensibilità e specificità relativi agli ultimi 5 anni. A tale scopo possono essere utilizzati i dati ottenuti, ad ogni sessione analitica, sui campioni definiti idonei come materiale di riferimento e/o sui campioni dei proficiency test. I parametri delle prestazioni del metodo, per i quali verificare il soddisfacimento dei requisiti, sono rappresentati da sensibilità, specificità e accuratezza. In caso di scostamento dei valori relativi ai parametri di prestazione del metodo ottenuti in sede di riesame rispetto ai requisiti specificati nei piani di validazione, la validazione deve essere ripetuta.

L'esito del riesame della validazione viene registrato utilizzando il modulo “Dichiarazione di idoneità” PGVDSP01.I2n.

7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA

La copia originale della presente procedura è conservata presso l'archivio SGQ dipartimentale gestito del RAQ-SP.

	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1

8. DESTINATARI

La procedura è distribuita in forma controllata dal RAQ-SP alle seguenti funzioni: DD-SP, RAF-BM, DR-SM, RSA-2-BM, RVD-1-BM e a tutto il personale tecnico abilitato all'esecuzione di attività di prova.

	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA		
LNRVTEC09.011	Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza	REV. 1	

Appendice 1

Condizioni per l'amplificazione e sequenze dei primers :

Determinante di virulenza	Nome del primer (ref.)	Sequenza del primer	Condizioni di PCR			Dimensioni del prodotto (bp)
			denaturation	annealing	extension	
VT1	KS7 (*)	5'-ccc gga tcc atg aaa aca tta tta ata gc-3'	94 °C 30"	52 °C 60"	72 °C 40"	285
	KS8 (*)	5'-ccc gaa tcc agc tat tct gag tca acg-3'		30 cicli		
VT2	GK3 (*)	5'-ccc gga tcc atg aag atg ttt atg gcg-3'	94 °C 30"	52 °C 60"	72 °C 40"	260
	GK4 (*)	5'-ccc gaa ttc tca gtc att att aaa ctg cac-3'		30 cicli		

(*) Russmann H, Kothe E, Schmidt H, Franke S, Harmsen D, Caprioli A, Karch H. Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. J Med Microbiol. 1995 Jun;42(6):404-10.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

Appendice 2

Preparazione dei reagenti:

La deperibilità dei reagenti preparati in laboratorio e descritti in questa sezione è calcolata sulla base dell'esperienza pregressa nell'esecuzione del metodo.

DEOSSIRIBONUCLEOTIDI (dNTP)

La soluzione di deossiribonucleotidi 10 mM o 2.5 mM viene acquistata pronta all'uso o alternativamente preparata in laboratorio partendo da soluzioni stock dei dNTP diluite in acqua (DNase/RNase free).

OLIGONUCLEOTIDI SINTETICI IN SOLUZIONE

Gli oligonucleotidi vengono acquistati sotto forma di prodotto di sintesi liofilizzato.

Preparazione

Sciogliere gli oligonucleotidi in acqua (DNase/RNase free, comprata pronta all'uso) alla concentrazione di 50 pmoli/μl. Suddividere in aliquote di almeno 100 μl e conservare a -20 °C. La soluzione così preparata ha deperibilità pari a due anni, così come le soluzioni di lavoro che ne derivano.

TAMPONE TRIS ACETATO EDTA (50X)

Composizione

Tris base	242.0 g
Acido acetico glaciale	57.1 ml
EDTA 0.5M pH 8.00	100 ml
Acqua fino a	1000 ml



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC09.011

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza

REV. 1

Preparazione (qualora non sia acquistato pronto all'uso)

Sciogliere i componenti in acqua. Suddividere in aliquote e conservare in bottiglie di vetro a temperatura ambiente. Il tampone ha deperibilità di un anno. Per ottenere la soluzione d'uso 1X aggiungere 20 ml di tampone 50X a 980 ml di acqua e avere cura di miscelare la soluzione.

EDTA 0.5 M pH 8.00

Acquistato pronto all'uso

I tamponi preparati in laboratorio vengono etichettati con data di preparazione e scadenza.

GEL DI AGAROSIO

Composizione

Agarosio in polvere	1-1.5%
tampone tris acetato (50X)	1/50 volume finale
Acqua	a volume

Preparazione

Aggiungere la polvere di agarosio all'acqua contenente il tampone e portare a volume. Sciogliere la polvere riscaldando la soluzione su una piastra riscaldante finché diventi limpida. Lasciare raffreddare e aggiungere il bromuro di etidio (vedi sez. 8.4 e 8.7) e colare nello stampo in cui è stato precedentemente inserito il pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento. Lasciare solidificare prima dell'uso.