

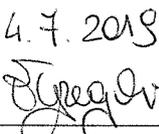
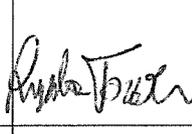
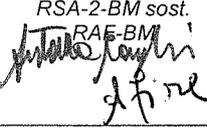
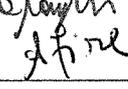
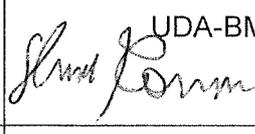


DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

Edizione/Rev.	In vigore il: RAQ-SP	Redazione RSA-2-BM	Verifica RSA-2-BM sost. RAF-BM sost	Approvazione DR-ZA
00/0	03.07.2014 R. Borroni	R. Tozzoli	S. Morabito L. Morelli	A. Caprioli
00/1	20.09.2016 R. Borroni	R. Tozzoli	S. Morabito L. Morelli	DR-ZA sost S. Morabito
00/2	R. Borroni	R. Tozzoli	A. Maugliani 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	4.7.2018 		RSA-2-BM sost. RAF-BM sost.  	UDA-BM 

Descrizione delle
modifiche:

In tutto il documento: correzione dei refusi; **Par. 2:** adeguamento e aggiornamento dei riferimenti **Par. 6.3:** adeguamento delle istruzioni d'uso dello strumento GeneDisc cycler; **Par. 6.3.2:** aggiunta delle specifiche per il salvataggio dei dati; **Par. 6.5:** Eliminazione riferimento al terreno mTSB e antibiotici; **Par. 6.5.1** inserimento del paragrafo: Materiali di riferimento (come da trattamento RNC 3 di 7 da audit interno); **Appendice 2:** Adeguamento della deperibilità degli oligonucleotidi.

Copia controllata n° _____

Copia non controllata



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE.....	3
2. RIFERIMENTI	4
3. DEFINIZIONI.....	5
4. ABBREVIAZIONI.....	6
5. RESPONSABILITA'.....	6
6. DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA.....	7
6.1 Preparazione del campione.....	7
6.2 Preparazione del DNA stampo per la reazione di RT-PCR.....	9
6.3 Allestimento delle reazioni di amplificazione.....	10
6.4 Attrezzature ed apparecchiature.....	15
6.5 Reagenti e terreni di coltura.....	15
6.5.1 Materiali di riferimento.....	16
6.6 Sicurezza e d.p.i.....	16
6.7 Interpretazione dei risultati	17
6.8 Controlli qualità	18
6.9 Riesame della validazione	19
7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA.....	20
8. DESTINATARI.....	20
APPENDICE 1. Geni rilevati con la RT-PCR e oligonucleotidi utilizzati.....	21
APPENDICE 2. Preparazione delle soluzioni di oligonucleotidi e sonde.....	23



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

I ceppi di *Escherichia coli* **produttori di verocitotossina (VTEC)**, o Shiga Tossina (STEC), patogeni per l'uomo possiedono geni codificanti le verocitotossine (VT) di tipo 1 e/o di tipo 2 (*vtx1* e *vtx2*) e producono la tossina stessa; la maggior parte di questi, possiede inoltre il gene *eae* che codifica il fattore di adesione intima, responsabile dell'effetto di "attaching/effacing". Inoltre, i ceppi in grado di causare malattia grave nell'uomo, appartengono principalmente ai sierogruppi O157, O26, O111, O103 ed O145 (Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) - Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types, 2007; Guidance on the technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food, 2009).

Lo scopo del presente metodo di prova è di rilevare la presenza dei geni *vtx1*, *vtx2* (tutti i sottotipi eccetto la *vtx2f*), *eae*, e dei geni associati ai sierogruppi O157, O26, O111, O103 e O145 tramite la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR) in campioni di prova costituiti da DNA estratto da colture batteriche provenienti dalle diverse matrici incluse nel campo di applicazione. La presente procedura corrisponde alla sola fase di screening del metodo standard ISO TS 13136:2012 "Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups".

Il campo di applicazione del presente metodo è costituito da campioni clinici (campioni fecali e colture batteriche come singoli isolati o colture miste), inviati al laboratorio per l'identificazione della presenza di VTEC. Sono **da considerarsi** parte del campo di applicazione del presente metodo di prova anche le preparazioni di DNA inviate come tali al laboratorio.

L'identificazione dei VTEC nelle diverse matrici, ottenuta con il presente metodo, è presuntiva in quanto non viene eseguita la fase di isolamento finalizzata alla verifica della



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

presenza simultanea di tutti i target nella stessa cellula batterica vitale. Nel caso della sua applicazione a ceppi batterici inviati al laboratorio come colture pure costituisce la caratterizzazione degli stessi.

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, Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations
- ISO 7218/Amd1:2013 "Microbiology of food and animal feeding stuffs –General requirement and guidance for microbiological examinations" + Corrected version:2014.
- 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 20837 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection
- ISO 20838 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods
- ISO/TS 20836 Microbiology of food and animal feeding stuffs-PCR for the detection of food-borne pathogens-Performance testing for thermal cyclers
- D. Lgs. 9 Aprile 2008, n. 81 - Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro (testo consolidato)
- ISO TS 13136:2012 "Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups”

- Guidance on the technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food, *EFSA Journal* 2009; 7:1366
- Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) - Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types, *EFSA Journal* 2007, 579: 1-61
- **ISO 11133 “Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media”- ISO 11133:2014/Amd.1:2018**
- POVDBM01 “Validazione dei metodi di prova biologia molecolare”
- PGCPSP01 “Gestione campione e pratiche”
- PGRQSP01 “Registrazioni della qualità”
- POQMSP01 “Controllo di qualità interno”
- **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 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 o Campione di prova: materiale consegnato al reparto **SM** in un unico invio, indipendentemente dal numero di Unità campionarie che lo compongono



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

LNRVTEC29.011	Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening	REV. 1
---------------	--	--------

- ID campione: codice identificativo del campione, come codificato dalla procedura “Gestione campione e pratiche” (PGCPSP01).

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
DNA	acido deossiribonucleico
DR	Direttore del Reparto
FE	Feci
ISS	Istituto Superiore di Sanità
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	Responsabile Settore Analitico LNR/ EURL <i>E. coli</i>
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SGQ	Sistema gestione della qualità
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)
SP	Dipartimento “Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria” (abbreviazione utilizzata 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

5. RESPONSABILITÀ

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



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

È 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). L'amplificazione è visualizzata in tempo reale (RT-PCR) mediante rilevazione attraverso un fotomoltiplicatore della fluorescenza emessa da sonde coniugate con fluorofori omologhe ai target. La fluorescenza è emessa ad ogni ciclo di amplificazione in seguito a degradazione della sonda ogni volta che viene sintetizzata una nuova copia di DNA.

La presente procedura prevede la ricerca dei geni codificanti le VT e l'intimina utilizzando gli oligonucleotidi e le sonde descritte nell'Appendice 1.

La procedura descritta è sequenziale: in caso di positività del campione alla presenza dei **geni *vtx1* e/o *vtx2*** unitamente **al gene *eae***, si procede all'identificazione del sierogruppo tramite l'amplificazione di regioni geniche associate ai principali sierogruppi VTEC: O157, O26, O111, O103 e O145. Gli oligonucleotidi e le sonde utilizzate per questa indagine sono descritte nella tabella in Appendice 1.

La metodica si articola in tre 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).**

6.1 Preparazione del campione

Per la registrazione delle fasi della preparazione del campione (arricchimento ed estrazione del DNA) vengono utilizzati fogli di lavoro dedicati (IOFLBM01.I34n).



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

- Criteri di conformità dei campioni

La verifica di conformità dei campioni viene effettuata al momento dell'accettazione 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.

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 inoculata in **9 / 10 ml** di brodo nutriente (TSB). Le colture liquide sono incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h. Le brodocolture vengono quindi immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.2).

6.1.2 Colture di arricchimento di feci in terreno liquido inviati al laboratorio come tali

All'arrivo in laboratorio le colture vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte nella sezione 6.2.

6.1.3 Colture batteriche

Sospensioni in "Criobanks" o altri crio-preservanti.

Prelevare in asepsi una perlina dalla provetta utilizzando un ago da infusione sterile e inoculare in 9 / 10 ml di terreno nutriente (TSB) in tubo per batteriologia. L'inoculo è incubato



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

a 37 ± 1 °C per 18-24 h. Le brodocolture vengono quindi immesse 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 in 9 / 10 ml di terreno nutriente liquido (TSB). Incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le colture vengono immesse nel flusso delle operazioni descritte in seguito (6.2).

Piastre di primo isolamento.

Prelevare il campione in asepsi con un’ansa sterile da 1 µl parte della patina batterica dalla zona di maggiore crescita (scarico) e inoculare in 9 / 10 ml di terreno nutriente liquido (TSB). Incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 h (6.2).

6.1.4 Tamponi di prelievo in terreno di trasporto

Prelevare il tampone in asepsi e seminarlo direttamente in 9 / 10 ml di terreno liquido nutriente (TSB). Incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le colture vengono immesse nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.2).

6.1.5 Campioni di acido nucleico

I campioni di acido nucleico inviati al laboratorio vengo immessi direttamente nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.3)

6.2 Preparazione del DNA stampo per la reazione di RT-PCR .

Prelevare 1 ml dalla brodocoltura di arricchimento e procedere all'estrazione del DNA alternativamente con Instagene Matrix Bio-Rad o qualunque altro prodotto commerciale basato sulla stessa tecnologia (resina non-immobilizzata) secondo il protocollo descritto dal produttore. Il DNA così preparato viene utilizzato come stampo per le successive analisi di RT-PCR, descritte di seguito. L'acido nucleico viene sempre diluito 1:10 prima dell'utilizzo. Nel caso di ceppi batterici isolati viene invece effettuata una diluizione 1:100.



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

6.3 Allestimento delle reazioni di amplificazione

Le reazioni di RT-PCR possono essere condotte mediante l'utilizzo dello strumento GeneDisc Cycler mediante l'impiego di kit commercializzati dalla PALL Life Sciences (GeneDiscs) in cui i reagenti (riportati in Appendice 1) sono assemblati in un sistema chiuso oppure mediante l'allestimento in laboratorio a partire dai singoli reagenti (riportati nel paragrafo 6.5 e in Appendice 1) utilizzando lo strumento Rotorgene RG-6000.

Di seguito vengono descritte le operazioni da effettuare per allestire le reazioni secondo le due procedure. Le registrazioni vengono effettuate sui fogli di lavoro dedicati, IOFLBM01.I34n.

6.3.1 RT-PCR con i GeneDisc (PALL Life Sciences)

1. Accendere la macchina GeneDisc Cycler **ed il monitor ad esso collegato** e inserire una nuova analisi (**cliccando sull'icona "analysis"**)
2. Leggere il codice a barre del "Gene Disc" e della relativa "Master Mix" fornita in kit con il lettore del GeneDisc Cycler ed inserire il nome dei campioni.
3. Preparare il GeneDisc per l'analisi secondo le indicazioni del costruttore. La MasterMix contenuta nei kit della PALL contiene la Taq, MgCl₂ e i dNTP mentre gli oligonucleotidi e le sonde si trovano liofilizzate nei pozzetti del GeneDisc, è quindi sufficiente aggiungere il DNA estratto come descritto nella sezione 6.2.
4. Prelevare 36 µl di DNA (preparato come descritto in 6.2) e introdurli insieme a 36 µl di MasterMix PALL in **ogni** settore del GeneDisc.
5. Utilizzare la pompa da vuoto del GeneDisc Cycler per caricare i campioni di ciascun settore nei vari pozzetti.
6. Aggiungere quattro gocce di olio minerale ad ogni settore ed utilizzare la pompa da vuoto del GeneDisc Cycler per stratificare l'olio nei vari pozzetti.



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

7. Quindi avviare l'analisi inserendo il GeneDisc nel blocco del termociclatore, chiudendo il coperchio della macchina, **e seguendo** le istruzioni visualizzate a schermo.

8. **Alla fine delle analisi spegnere lo strumento cliccando sul comando "shut down", dopo aver seguito le indicazioni dello stesso.**

Ogni settore del GeneDisc contiene un controllo di inibizione **che permette anche di monitorare il corretto funzionamento della reazione di PCR,** ad ogni sessione di lavoro. I risultati sono visualizzati direttamente sul monitor del GeneDisc Cycler e riportati nel foglio di lavoro IOFLBM01.I34n.

Il sistema è disegnato in modo da non poter utilizzare reagenti dopo la data di scadenza attraverso la generazione di un messaggio di errore alla lettura dei codici a barre.

Per l'identificazione della presenza dei geni di virulenza e del sierogruppo O157 i campioni vengono analizzati con il kit PALL "O157 & STEC".

Per l'identificazione dei sierogruppi O26, O111, O103 e O145, i campioni vengono analizzati con il kit GeneDisc "EHEC Identification".

Al termine dei cicli di amplificazione, seguire la procedura guidata del GeneDisc Cycler. I dati relativi all'analisi vengono automaticamente raccolti in una cartella identificata con la data, l'orario e una sigla relativa al tipo di dischetto (ST per il disco "O157 & STEC" e EH per il disco "EHEC Identification"). In allineamento con quanto previsto nella procedura "Registrazioni della qualità" (PGRQSP01) per la protezione ed integrità dei dati conservati su supporti informatici, dopo ogni analisi, la cartella relativa viene esportata su un disco esterno USB e salvata in una cartella creata appositamente sullo spazio remoto dedicato al dipartimento. Hanno accesso a tale cartella il RSA-BM, il suo sostituto e i PTP, che hanno la responsabilità del trasferimento dei dati nello spazio remoto del dipartimento.



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

LNRVTEC29.011	Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening	REV. 1
---------------	--	--------

6.3.2 RT-PCR con il Rotorgene RG-6000

Viene di seguito descritto il procedimento per effettuare le RT-PCR con sistema aperto mediante l'utilizzo dello strumento Rotorgene RG-6000.

Le reazioni per l'identificazione dei geni *vtx1* e *vtx2* vengono condotte in multiplex, unitamente al controllo interno di amplificazione. Per quanto riguarda gli altri target, vengono amplificati uno alla volta, insieme al controllo interno di amplificazione. Le reazioni vengono allestite in 20 µl totali per ciascun campione, analizzato in duplicato, e sono composte come segue:

Mix per campione (<i>vtx1/vtx2</i>):	
QuantiFast pathogen Mastermix (Qiagen) 5X	4 µl (1X)
Primer vtx FWD (20 µM)	1 µl (1 µM)
Primer vtx REV (20 µM)	1 µl (1 µM)
vtx1 Probe FAM (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
vtx2 Probe ROX (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
Internal Control Assay MAX 10X	2 µl (1X)
DNA test	2 µl
Internal Control DNA	2 µl
Acqua	7.2 µl
Volume tot.	20 µl

Mix per campione (tutti gli altri target):	
QuantiFast pathogen Mastermix (Qiagen) 5X	4 µl (1X)
Primer FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Primer REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Probe FAM (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
Internal Control Assay 10X	2 µl (1X)
DNA test	2 µl
Internal Control DNA	2 µl
Acqua	8.6 µl
Volume tot.	20 µl



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

Viene allestita una miscela di reazione unica preparata tenendo conto del numero totale dei campioni da saggiare e del fatto che devono venire testati in duplicato, sottraendo il volume del DNA stampo. Per preparare la miscela di reazione unica si utilizza il foglio di lavoro dedicato (IOFLBM01.I34n) e si esegue questo calcolo:

- Ogni componente della mix per campione viene moltiplicato per 2.5 (campioni analizzati in duplicato)
- Ogni componente della mix per duplicato, tranne i volumi dei DNA test e Internal Control, viene moltiplicato per il numero totale di campioni più 0.5 (campioni.5) o 1 (ad esempio per 10 campioni si moltiplica x10.5 o x11)
- Prelevare 40 µl dalla mix unica e dispensarli in tanti microtubi quanti sono i campioni
- Aggiungere ad ogni tubo 5 µl di DNA test e 5 µl di Internal Control DNA, prelevare per due volte un volume pari a 20 µl e inserirlo in altrettanti tubi per RT-PCR.

Per la preparazione delle soluzioni stock e di lavoro degli oligonucleotidi e delle sonde, si rimanda all'Appendice 2.

Nel corso di ciascuna sessione analitica vengono inoltre aggiunti un controllo positivo (DNA di stipiti di riferimento estratti come descritto nel paragrafo 6.2) e un controllo negativo costituito da acqua sterile al posto di DNA test (No Template Control, NTC).

In seguito all'allestimento delle reazioni, procedere con l'amplificazione mediante RT PCR. Accendere lo strumento Rotor-Gene RG-6000 ed inserire il rotore con i tubi di reazione. Lanciare il programma Rotor-Gene 6000 Series e creare una nuova analisi. Specificare il tipo di rotore utilizzato (36 o 72 microtubi) e inserire il seguente profilo termico per tutti i target tranne il gene associato al sierogruppo O103:

1. 5 min a 95 °C
2. 15 sec a 95 °C
3. 60 sec a 60 °C

Ripetere punti 2 e 3 per 40 volte.



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

Il profilo termico per l'amplificazione del gene associato al sierogruppo O103 è il seguente:

1. 5 min a 95 °C
2. 15 sec a 95 °C
3. 60 sec a 55 °C

Ripetere punti 2 e 3 per 40 volte.

Inserire la lettura della fluorescenza dopo il punto 3 nei seguenti canali:

- RT-PCR vtx1/vtx2: verde (FAM target vtx1), arancione (ROX target vtx2) e giallo (MAX internal control)
- RT-PCR per tutti gli altri target: verde (FAM target) e giallo (MAX internal control)

ed avviare la RT-PCR.

Scegliere la cartella di destinazione del file (cartella RT-PCR ZA sul desktop).

Nominare i campioni in esame e inserire per ognuno il tipo di campione (colonna "Type"). In particolare, per i campioni di DNA test inserire come tipo "Unknown", per il campione positivo inserire "Positive Control" e per il negativo "No Template Control (NTC)". Dare l'OK e attendere che la RT-PCR sia terminata per registrare i risultati.

Al termine dei cicli di amplificazione i dati relativi all'analisi vengono automaticamente raccolti nella cartella RT-PCR ZA sul desktop, identificata con la data, l'identificativo del campione, il gene target. In allineamento con quanto previsto nella procedura "Registrazioni della qualità" (PGRQSP01) per la protezione ed integrità dei dati conservati su supporti informatici, dopo ogni analisi, il file relativo viene esportato su un disco esterno USB e salvato in una cartella creata appositamente sullo spazio remoto dedicato al dipartimento. Hanno accesso a tale cartella il RSA-2-BM, il suo



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

LNRVTEC29.011	Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening	REV. 1
---------------	--	--------

sostituito e i PTP, che hanno la responsabilità del trasferimento dei dati nello spazio remoto del dipartimento.

6.4 Attrezzature ed apparecchiature

- Bagnomaria
- Cappa a flusso laminare
- Cappa a flusso laminare per PCR
- Anse da batteriologia monouso da 1 e 10 µl
- Termostato a 37 ±1 °C
- Frigo-congelatore
- Pipette automatiche a volume variabile (P10, P20, P100, P200, P1000)
- Pipette da 2, 5, 10 e 25 ml
- Bilancia
- Puntali sterili con e senza filtro anti-aerosol
- Becker da 1 l
- Provette tipo Eppendorf da 1,5 ml
- Provette tipo Eppendorf da 2 ml
- Provette da 0,2 e da 0,1 ml per RT-PCR
- Piastra riscaldante
- Apparato per RT-PCR GeneDiscCycler
- Apparato per RT-PCR Rotorgene RG-6000
- Personal computer con il software dedicato

6.5 Reagenti e terreni di coltura

- Acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti
- InstaGene Matrix Bio-Rad, 20 ml o equivalenti



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

LNRVTEC29.011	Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening	REV. 1
---------------	--	--------

- GeneDisc Pathogenic *E. coli* O157 and STEC – 6 settori
- GeneDisc EHEC Identification – 6 settori
- Terreno TSB
- Acqua peptonata
- QuantiFast pathogen +IC Kits (Qiagen) 5X, contenente la mastermix e i reagenti necessari per il controllo interno di amplificazione.
- Oligonucleotidi e sonde riportati in appendice 1, relative ai target: *vtx1*, *vtx2*, *eae*, *rfaE*_{O157} (gene associato al sierogruppo O157), *wbdl*_{O111} (O111), *wzx*_{O26} (O26), *ihp1*_{O145} (O145), *wzx*_{O103} (O103).

6.5.1 Materiali di riferimento

I materiali di riferimento sono costituiti dal DNA estratto dai ceppi batterici di riferimento, gestiti secondo la POMRBM01.0n, utilizzando la stessa metodica impiegata per l'estrazione del DNA dei campioni oggetto della prova.

- **Ogni stipite di riferimento viene utilizzato per i diversi target delle reazioni di RT-PCR. I dettagli degli stipiti di riferimento sono descritti di seguito:**
C210-03: stipite di riferimento positivo per i geni *vtx1*; *vtx2*; *eae*; O157.
- **C1178-04: stipite di riferimento positivo per i geni *vtx1*; *eae*; O145.**
- **MM13-02: stipite di riferimento positivo per i geni *eae*; O111**
- **C125-06: stipite di riferimento positivo per i geni *vtx2*; *eae*; O103**
- **C1188-02: stipite di riferimento positivo per i geni *vtx1*; *vtx2*; *eae*; O26**

6.6 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.



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

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 (testo consolidato)* 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.

6.7 Interpretazione ed espressione dei risultati

Il campione di prova positivo presenta un incremento di fluorescenza all'aumentare dei cicli di amplificazione, relativamente al canale del gene target. La eventuale presenza di amplificazione nei controlli negativi, nello stesso canale del gene target, comporta la ripetizione della RT-PCR. Controllare che non vi sia inibizione nei campioni testati, esaminando le amplificazioni relative al controllo interno di amplificazione. Nel caso del GeneDisc PALL verificare che il controllo di inibizione mostri un ciclo soglia (C_T) tra 28 e 35. Nel caso della RT PCR effettuata con Rotorgene RG-6000, una buona amplificazione dello IAC consiste in valori di CT pari a 25-33 (sulla base dei dati pregressi e dei valori determinati nel corso della valutazione dell'equivalenza). In caso di mancata fluorescenza relativa al controllo di inibizione, si procede alla ripetizione della reazione diluendo ulteriormente il campione 1:10 o ad una nuova estrazione dell'acido nucleico ove possibile e se il problema persista.

Sul rapporto di prova sono riportati i geni per i quali il campione di prova è risultato positivo. Qualora il cliente provveda all'estrazione ed invio dell'acido nucleico, in caso di mancata fluorescenza relativa al controllo di inibizione, si procede alla ripetizione della reazione diluendo ulteriormente il campione 1:10 o si riporta sul rapporto di prova la dicitura "campione inibito" ove il problema persista.

In alcuni casi può capitare che si rilevino positività nelle regioni basse del grafico (oltre i 35 cicli di amplificazione). Nel caso si rilevassero tali positività tardive il risultato viene valutato caso per caso. Nel caso in cui la positività riguardasse una sola delle due repliche, la prova



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

non viene ripetuta e viene considerata positiva per segnali che salgono entro il 35° ciclo di amplificazione mentre i campioni vengono considerati negativi, caso per caso, se il segnale, su una singola replica, sale oltre il 35° ciclo di amplificazione.

La corretta valutazione del risultato è subordinata alla osservazione dell'amplificazione nei controlli positivi e **della sua eventuale** assenza nei controlli negativi.

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

6.8 Controlli Qualità

Le confezioni di GeneDiscs e di QuantiFast pathogen Mastermix (Qiagen) 5X contengono un certificato di conformità del lotto rilasciato dalla PALL e dalla Qiagen, rispettivamente, che all'apertura delle confezioni vengono conservati **allegati alla scheda prodotto**. In ogni settore del GeneDisc, inoltre, è presente il controllo di inibizione che permette di monitorare il corretto andamento di ogni sessione analitica. Quando il numero di campioni da analizzare tramite il presente metodo è minore del numero dei settori di un GeneDisc, vengono inseriti nella analisi DNA di stipiti di riferimento estratti come descritto nel paragrafo 6.2, o dei controlli negativi.

Nelle analisi condotte mediante il sistema aperto, vengono inclusi in ogni sessione analitica un controllo positivo ed uno negativo.

I risultati relativi ai controlli positivi e negativi sono riportati nella Carta di controllo di qualità interno per i metodi qualitativi (POQMSP01.11n), al fine di determinare il trend dei risultati del laboratorio ed intraprendere, se necessario, azioni preventive per consentire il miglioramento **della performance**. Le carte di controllo riportano i risultati dei controlli in ordinata e in ascissa il riferimento o la data di applicazione del metodo, indicandoli come segue: +1 quelli



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

LNRVTEC29.011	Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening	REV. 1
---------------	--	--------

corretti (sia per il controllo positivo che per quello negativo) e -1 quelli errati (nel caso in cui uno o entrambi i controlli non abbiano dato il risultato atteso).

Nel caso in cui l'arricchimento preveda l'utilizzo di terreni con supplemento o da ricostituire si effettua il controllo di qualità come segue:

con 2 ml del terreno preparato per l'arricchimento viene allestita una brodocoltura utilizzando il ceppo di riferimento O157:H7 C210-03 che non fermenta il sorbitolo. Verificare l'intorbidamento della brodocoltura dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 18-24 ore. Il controllo della specificità della crescita viene eseguita seminando la brodocoltura su terreno solido SMAC con lettura delle piastre dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 18-24 ore. Tutte le colonie devono mostrare il tipico aspetto incolore mentre eventuali colonie contaminanti possono essere riconosciute dal colore rosso.

6.9 Riesame della validazione

Per quanto attiene al riesame della validazione del metodo effettuato dal personale, si fa riferimento a quanto riportato nella 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, 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.



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA

La copia in formato cartaceo della presente procedura è conservata presso l'archivio Dipartimentale gestito dal RAQ-SP.

8. DESTINATARI

La procedura è distribuita dal RAQ-SP in forma controllata alle seguenti funzioni: DD-SP, DR-SM, RAF-BM, RSA-2-BM, PTP abilitato alla esecuzione della prova.



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

LNRVTEC29.011	Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening	REV. 1
---------------	--	--------

APPENDICE 1

Geni rilevati con la RT-PCR e oligonucleotidi utilizzati

Gene target	Oligonucleotidi Forward, reverse e sonde (5'-3')	Bibliografia
<i>vtx1</i>	<i>vtx</i> fwd: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG <i>vtx</i> rev: CCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Sonda -CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>vtx2</i>	<i>vtx</i> fwd: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG <i>vtx</i> rev: CCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Sonda -TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004, 18 :185-192
<i>eae</i>	<i>eae</i> fwd: CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA <i>eae</i> rev: CTCATGCGGAAATAGCCGTTA Sonda -ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	Møller Nielsen E. and Thorup Andersen M. J clin Microbiol 2003, 41 :2884-2893
<i>rfbE</i> _{O157} (O157)	O157 fwd: TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA O157 rev: CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT Sonda -AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wbdl</i> _{O111} (O111)	O111 fwd: CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT O111 rev: TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC Sonda -TTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wzx</i> _{O26} (O26)	O26 fwd: CGCGACGGCAGAGAAAATT O26 rev: AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTTT Sonda -CCCGTTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>ihp1</i> _{O145} (O145)	O145 fwd: CGATAATATTTACCCACCAAGTACAG O145 rev: GCCGCCGCAATGCTT Sonda -CCGCCATTCAGAATGCACACAATATCG	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wzx</i> _{O103} (O103)	O103 fwd: CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT O103 rev: GAAAAAAGCACCCCGTACTTAT Sonda -CATAGCCTGTTGTTTTAT	Perelle S. et al. J Appl Microbiol 2005 98 :1162- 1168



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

Riferimenti Bibliografici

- Nielsen EM, Andersen MT. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol.* **41**:2884-93
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes.* **18**:185-92.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol.* **98**:1162-1168.



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

LNRVTEC29.011

Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati ad infezioni umane - Metodo di screening

REV. 1

APPENDICE 2

Preparazione delle soluzioni di oligonucleotidi e sonde

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

Preparazione soluzioni stock:

Sciogliere gli oligonucleotidi in acqua (DNase/RNase free, comprata pronta all'uso) alla concentrazione di 100 pmoli/ μ l (μ M). Suddividere in aliquote di **almeno** 100 μ l e conservare a -20 °C.

Sciogliere le sonde in acqua (DNase/RNase free, comprata pronta all'uso) alla concentrazione di 50 pmoli/ μ l (μ M). Dispensare in aliquote da **almeno** 100 μ l e conservare a -20 °C.

La soluzione così preparata ha deperibilità pari a due anni, così come le soluzioni di lavoro che ne derivano.

Preparazione soluzioni di lavoro:

Le soluzioni di lavoro vengono preparate in aliquote da 100 μ l a partire da una soluzione stock. Diluire le soluzioni stock 1:5 per ottenere oligonucleotidi con concentrazione di 20 μ M e sonde con concentrazione pari a 10 (μ M).