



DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

Reparto Zoonosi trasmesse da alimenti

POMIZA 01.001

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

REV. 1

Rev.	In vigore il: RAQ-ZA	Redazione RPM-ZA	Verifica RAQ-ZA	Approvazione DR-ZA
0	Clarissa Ferreri 20/05/2011	Rosangela Tozzoli	Clarissa Ferreri	Alfredo Caprioli
1	<i>C Ferreri</i> 01/07/2011	<i>Rosangela Tozzoli</i>	<i>C Ferreri</i>	<i>Alfredo Caprioli</i>

Descrizione delle modifiche:

Revisione del titolo e del campo di applicazione del metodo stesso

Copia controllata n° 1

Copia non controllata



POMIZA 01.001	<u>Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati a infezioni umane - Metodo di screening</u>	REV. 1
---------------	---	--------

INDICE

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE.....	3
2. RIFERIMENTI NORMATIVI.....	3
3. DEFINIZIONI.....	4
4. ABBREVIAZIONI.....	4
5. RESPONSABILITA'.....	5
6. DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA.....	5
6.1 Preparazione del campione.....	6
6.2 Preparazione del DNA stampo per la reazione di RT-PCR.....	7
6.3 Allestimento delle reazioni di amplificazione.....	7
6.4 Attrezzature ed apparecchiature.....	8
6.5 Reagenti.....	8
6.6 Sicurezza e d.p.i.....	9
6.7 Interpretazione dei risultati	9
6.8 Controlli qualità	9
7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA.....	10
8. DESTINATARI.....	10
APPENDICE 1. Geni rilevati con la RT-PCR e oligonucleotidi utilizzati.....	11
APPENDICE 2. Preparazione dei terreni.....	13
ALLEGATO 1	
Modulo: Foglio di lavoro per RT-PCR.....	14



POMIZA 01.001

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

REV. 1

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

I ceppi di *Escherichia coli* VTEC patogeni per l'uomo possiedono geni codificanti le verocitotossine (VT) di tipo I e/o di tipo II (*vtx1* e *vtx2*) 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". 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 della ISO/WD TS 13136 "Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups - Qualitative Method" attualmente in fase di pubblicazione in ambito ISO.

Il campo di applicazione del presente metodo è costituito da **campioni clinici (campioni fecali e colture batteriche come singoli isolati o colture miste) ed** alimenti, inviati al laboratorio per l'identificazione della presenza di VTEC. Sono 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 presenza simultanea di tutti i target nella stessa cellula batterica vitale.

Le differenti tipologie di campioni di prova e i relativi trattamenti sono elencati in dettaglio al punto 6.1.

2. RIFERIMENTI NORMATIVI

- 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 22174, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions



POMIZA 01.001

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

REV. 1

- 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
- 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)
- CEN ISO TS 13136 "Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups - Qualitative Method"
- 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

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 ZA in un unico invio, indipendentemente dal numero di Unità campionarie che lo compongono

4. ABBREVIAZIONI

DD	Direttore di Dipartimento
DR	Direttore del Reparto
ISS	Istituto Superiore di Sanità
DNA	acido deossiribonucleico
mTSB	modified Tryptone Soy Broth
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RAQ	Responsabile Assicurazione Qualità
RPM	Responsabile Prove Molecolari
SGQ	Sistema gestione della qualità
TPM	Tecnico Prove Molecolari
TSB	Tryptone Soy Broth
VT	Verocitotossina
VT1	Verocitotossina di tipo I



POMIZA 01.001	<u>Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati a infezioni umane - Metodo di screening</u>	REV. 1
---------------	--	--------

VT2	Verocitotossina di tipo II
VTEC	<i>E. coli</i> produttori di Verocitotossina
ZA	Reparto Zoonosi Trasmesse da Alimenti

5. RESPONSABILITÀ

L'esecuzione del presente metodo, la verifica dell'idoneità del campione, la registrazione delle operazioni e dei dati grezzi è responsabilità delle seguenti funzioni:

- TPM

La responsabilità della convalida dei risultati, delle osservazioni e dei calcoli è delle seguenti funzioni:

- RPM
- DR-ZA

E' responsabilità del RAQ-ZA 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 del gene *eae* unitamente ai geni *vtx1* e/o *vtx2*, 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)**



POMIZA 01.001

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

REV. 1

6.1 Preparazione del campione

Per le fasi della preparazione del campione viene utilizzato il modulo POMIZA01.10n.

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 10 ml di brodo nutriente (TSB) Le colture liquide sono incubate a 37 °C +/-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 o di alimenti 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 infissione sterile e inoculare in 10 ml di terreno nutriente (TSB) in tubo per batteriologia. L'inoculo è incubato a 37 °C +/-1 °C per 18-24 h. Le brodocolture vengono quindi 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 in 10 ml di terreno nutriente liquido (TSB). Incubare a 37 °C +/-1 °C per 18-24 h. A questo punto le colture vengono immerse 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 10 ml di terreno nutriente liquido (TSB). Incubare a 37 °C +/-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 10 ml di terreno liquido nutriente (TSB). Incubare a 37 °C +/-1 °C per 18-24 h. A questo punto le colture vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito (6.2).

6.1.5 Campioni di alimenti

- Per l'arricchimento di matrici alimentari un'aliquota pari a 25 g di campione viene arricchita in 225 ml di uno tra i seguenti terreni (Appendice 2):
 - modified TSB+ Novobiocina, quando si tratta un alimento diverso da latte e derivati del latte



POMIZA 01.001

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

REV. 1

- modified TSB + Acriflavina, nel caso si tratti un campione di latte o derivati
- Acqua Peptonata, per campioni che potrebbero contenere cellule batteriche stressate, come ad esempio campioni congelati
- Le colture di arricchimento vengono inserite nel flusso delle operazioni descritte nella sezione 6.2.

6.1.6 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 il kit Food Extraction Pack PALL o 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.

6.3 Allestimento delle reazioni di amplificazione

La presente procedura è basata sull'utilizzo dei kit commercializzati dalla PALL Life Sciences (GeneDiscs) in cui i reagenti riportati in Appendice 1 sono assemblati in un sistema chiuso. Di seguito vengono descritte le operazioni da effettuare per allestire le reazioni.

6.3.1 RT-PCR

1. Accendere la macchina GeneDisc Cyclor e inserire una nuova analisi.
2. Leggere il codice a barre del "Gene Disc" e della relativa "Master Mix" fornita in kit con il lettore del GeneDisc Cyclor 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 37 µl di DNA (preparato come descritto in 6.2) e introdurli insieme a 37 µl di MasterMix PALL in un settore del GeneDisc.
5. Utilizzare la pompa da vuoto del GeneDiscCyclor 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 GeneDiscCyclor per stratificare l'olio nei vari pozzetti.



POMIZA 01.001

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

REV. 1

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

Ogni settore del Genedisc contiene un controllo positivo (controllo di inibizione) e un controllo negativo, pertanto non è necessario inserire controlli di processo addizionali ad ogni sessione di lavoro. I risultati sono visualizzati direttamente sul monitor del GeneDiscCycler e riportati nel modulo POMIZA01.10n.

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".

6.4 Attrezzature ed apparecchiature

- Cappa a flusso laminare
- Cappa a flusso laminare per PCR
- Anse da batteriologia
- Termostato a 37 °C +/- 1 °C
- Frigo-congelatore (+4 °C/-20 °C)
- Pipette a volume variabile (P10, P20, P100, P200, P1000)
- 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 ml per RT-PCR
- Piastra riscaldante
- Apparato per RT-PCR GeneDiscCycler

6.5 Reagenti e terreni di coltura

- Acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti
- Food Extraction Pack PALL, o equivalenti
- InstaGene Matrix Bio-Rad, 20 ml o equivalenti
- GeneDisc Pathogenic *E. coli* O157 and STEC – 6/12 settori
- GeneDisc EHEC Identification - 6/12 settori
- Terreno TSB (acquistato pronto all'uso)
- Acqua peptonata
- Sali biliari n. 3
- Novobiocina
- Acriflavina



POMIZA 01.001

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

REV. 1

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.

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.

6.7 Interpretazione dei risultati

Il campione di prova positivo presenta un incremento di fluorescenza all'aumentare dei cicli di amplificazione. La presenza di amplificazione nei controlli negativi comporta la ripetizione della RT-PCR. In caso di mancata fluorescenza relativa al controllo di inibizione, si procede alla ripetizione della reazione diluendo il campione 1:10 o ad una nuova estrazione dell'acido nucleico ove 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 come segue:

Nel caso in cui la positività riguardasse una sola delle due repliche la prova viene ripetuta per segnali che salgono entro il 35° ciclo di amplificazione mentre i campioni vengono considerati negativi se il segnale su una singola replica sale oltre il 35° ciclo di amplificazione.

6.8 Controlli Qualità

Controlli positivi vengono analizzati ad ogni arrivo di un nuovo lotto di reagenti. I risultati sono riportati in un grafico (carta di controllo) al fine di determinare il trend 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 numero del rapporto di prova (PORTZA01.00n). I punti sul grafico esprimono il corretto o errato risultato del controllo positivo (+1 e +2 rispettivamente) e corretto o errato risultato del controllo negativo (-1 e -2 rispettivamente).



POMIZA 01.001

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

REV. 1

Nel caso in cui l'arricchimento preveda l'utilizzo di terreni con supplemento o da ricostituire (BPW) 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 brodo coltura dopo incubazione a 37 °C +/- 1 °C. Il controllo della specificità della crescita viene eseguita seminando la brodo coltura su terreno solido SMAC con lettura delle piastre dopo incubazione a 37 °C +/- 1 °C. Tutte le colonie devono mostrare il tipico aspetto incolore mentre eventuali colonie contaminanti possono essere riconosciute dal colore rosso.

7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA

La copia in formato cartaceo della presente procedura è conservata presso l'archivio del RAQ-ZA

8. DESTINATARI

La procedura è distribuita in forma controllata alle seguenti funzioni: DD-SP, RAQ-SP, DR-ZA, RAQ-ZA, RPM-ZA, TPM-ZA.



POMIZA 01.001

**Ricerca di *E. coli* produttore di Verocitotossina (VTEC)
e identificazione dei sierogruppi maggiormente
associati a 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>	stx fwd: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG stx rev: CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Sonda -CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>vtx2</i>	stx fwd: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG stx rev: CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Sonda -TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004, 18 :185-192
<i>eae</i>	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA CTCATGCGGAAATAGCCGTTA Sonda -ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	Møller Nielsen E. and Thorup Andersen M. J clin Microbiol 2003, 41 :2884-2893
<i>rfbE</i> (O157)	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT Sonda -AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wbdl</i> (O111)	CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC Sonda -TTGAATCTCCAGATGATCAACATCGTGAA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wzx</i> (O26)	CGCGACGGCAGAGAAAATT AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTT Sonda -CCCCGTTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>ihp1</i> (O145)	CGATAATATTTACCCACCAGTACAG GCCGCCGCAATGCTT Sonda -CCGCCATTGAGAATGCACACAATATCG	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
* <i>wzx</i> (O103)	CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT GAAAAAAGCACCCCGTACTTAT Sonda -CATAGCCTGTTGTTTTAT	Perelle S. et al. J Appl Microbiol 2005 98 :1162-1168



POMIZA 01.001	<u>Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati a infezioni umane - Metodo di screening</u>	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.



POMIZA 01.001

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

REV. 1

APPENDICE 2

Preparazione dei terreni

Modified Tryptone Soy Broth (mTSB)

- Aggiungere 1,5 g di sali biliari n. 3 ad 1 l di TSB sterile.
- Sterilizzare mediante filtrazione su membrana.

Soluzione di Novobiocina (da preparare il giorno di utilizzo)

- Sciogliere 0,16 g di Novobiocina in 10 ml di acqua.
- Sterilizzare mediante filtrazione su membrana.

Soluzione di Acriflavina (da preparare il giorno di utilizzo)

- Sciogliere 0,12 g di acriflavina in 10 ml di acqua.
- Sterilizzare mediante filtrazione su membrana.

Preparazione del terreno completo

- Aggiungere 1 ml di soluzione di Novobiocina o di soluzione di Acriflavina ad 1 l di mTSB subito prima di utilizzarlo.

La concentrazione finale della Novobiocina è 16 mg/l mentre quella dell'acriflavina è 12 mg/l.

Acqua Peptonata

- Sciogliere 20 g di terreno disidratato in 1 l di acqua distillata.

Sterilizzare mediante autoclave per 15 minuti a 121 °C.



DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

Reparto Zoonosi trasmesse da alimenti

POMIZA 01.001	<u>Ricerca di <i>E. coli</i> produttore di Verocitotossina (VTEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati a infezioni umane - Metodo di screening</u>	REV. 1
---------------	---	--------

ALLEGATO 1

Modulo: [Foglio di lavoro per RT-PCR](#)

Codice del modulo: POMIZA 01.I00

Rev 0 del 20.05.2011



Reparto Zoonosi trasmesse da alimenti

POMIZA 01.100

Foglio di lavoro per RT-PCR

REV. 0

Protocollo Reparto ZA _____

Data _____

Tipo di campione¹ _____

Funzione _____

I.D. Unità campionaria _____

Firma _____

Semina in:

 TSB Marca: _____ Lotto: _____

Supplementi:

 Acriflavina Marca: _____ Lotto: _____ Novobiocina Marca: _____ Lotto: _____ Sali biliari Marca: _____ Lotto: _____ Acqua peptonata Marca: _____ Lotto: _____

Incubatore: 37 °C SGQ- _____ -ZA

CQ: SMAC Marca: _____ Lotto: _____ Esito _____

Preparazione DNA Stampo

Kit utilizzato: _____ Marca: _____ Lotto: _____

Data _____ Funzione _____ Firma _____

Lotto GeneDisc STEC e O157: _____

Lotto Mastermix: _____

Risultati RT-PCR (SGQ-049-ZA):

Target	Risultato
<i>eae</i>	
<i>vtx1</i>	
<i>vtx2</i>	
O157	

Data _____ Funzione _____ Firma _____

¹ Specificare il tipo di campione come indicato in PGCAZA01.00n



DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE

Reparto Zoonosi trasmesse da alimenti

POMIZA 01.I00

Foglio di lavoro per RT-PCR

REV. 0

Lotto GeneDisc EHEC identification: _____

Lotto Mastermix: _____

Risultati RT-PCR (SGQ-049-ZA):

Target	Risultato
O26	
O111	
O103	
O145	

Data _____ Funzione _____ Firma _____

Verificato il: _____ Funzione _____ Firma _____