



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
------------	---	--------

Edizione/Rev.	In vigore il: RAQ-SP	Redazione PTP-4-BM	Verifica PTP-5-BM RAF-BM	Approvazione DR-PM
00/0	G. Ciccaglioni 14.01.2015	F. Anniballi	B. Auricchio / A. Fiore	L. Cozzi
00/1	G. Ciccaglioni 10.08.2016	F. Anniballi	B. Auricchio / A. Fiore	D. De Medici
01/0	03.11.17 			UDA-BM

Descrizione delle modifiche:	Intestazione: adeguamento alla nuova denominazione del dipartimento; In tutto il documento: aggiornamento dei riferimenti alla denominazione del dipartimento e del reparto come definiti in seguito al riordino dell'ISS; adeguamento alle nuove prescrizioni della procedura generale "Gestione documentazione"; Correzione dei refusi.
------------------------------	--

Copia controllata n° _____

Copia non controllata



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	5
2. RIFERIMENTI	5
3. TERMINI E DEFINIZIONI	7
3.1 Clostridi produttori di tossine botuliniche	7
3.2 Clostridium botulinum	7
3.3 Tossine botuliniche	8
3.4 Botulismo	8
3.5 Campioni biologici	9
3.6 Alimenti acidi o acidificati	9
3.7 Geni bonts	9
3.8 Estrazione del DNA	9
3.9 Multiplex real-time PCR	9
3.10 Primer	9
3.11 Sonda a idrolisi	9
3.12 Basi LNA™	10
3.13 Template	10
3.14 Controllo positivo di PCR	10
3.15 Controllo negativo di PCR	10
3.16 No template control	10
3.17 Controllo di Processo (CP)	10
3.18 Controllo positivo di CP	10
3.19 Background	10
3.20 Linea di base	11
3.21 Ciclo soglia (Ct)	11
4. ABBREVIAZIONI	11
5. RESPONSABILITÀ	11
6. NORME DI IGIENE E SICUREZZA	12
7. APPARECCHIATURE	12
8. MATERIALI	13
9. MATERIALI DI RIFERIMENTO	14
9.1 Preparazione dei controlli positivi di PCR	15
9.2 Preparazione del Controllo di Processo	15



CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

10. PREPARAZIONE TERRENI E REAGENTI	16
10.1 Triptone Peptone Glucose Yeast extract (TPGY)	16
10.1.1 Composizione del terreno	16
10.1.2 Preparazione	17
10.2 Triptone Peptone Glucose Yeast extract tamponato (TPGY tamponato)	17
10.2.1 Composizione della base	17
10.2.2 Composizione del tampone	17
10.2.3 Preparazione del TPGY tamponato	17
10.3 Egg Yolk Agar (EYA)	17
10.3.1 Composizione del terreno	17
10.3.2 Preparazione	18
10.4 Tampone Fosfato Gelatina	18
10.4.1 Composizione del Tampone Fosfato Gelatina	18
10.4.2 Preparazione	18
10.5 Cooked Meat Fortificato (CMF)	18
10.5.1 Composizione del terreno	18
10.5.2 Preparazione	18
10.6 McClung Toabe Medium (MCTM)	19
10.6.1 Composizione del terreno	19
10.6.2 Preparazione	19
10.7 Soluzione Acqua + Tween 80	19
10.7.1 Composizione	19
10.7.2 Preparazione	19
10.8 Chelex 100 (sospensione per l'estrazione degli acidi nucleici)	19
10.8.1 Preparazione	19
10.9 Master mix per real-time PCR (aliquotazione e modalità di conservazione/utilizzo)	20
10.10 Primers	20
10.11 Sonda	22
10.12 CP	23
11. REQUISITI E MODALITÀ DI MANIPOLAZIONE/CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	23
12. PRINCIPIO DEL METODO	24
13. DESCRIZIONE DEL PROCEDIMENTO	25
13.1 Tipologia di campione da sottoporre ad analisi	25
13.2 Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento	25
13.2.1 Campioni alimentari e mangimi in porzione test da 25 g	25
13.2.2 Residui di campioni alimentari e mangimi	26
13.2.3 Tamponi rettali	27
13.2.4 Lavaggi intestinali (enema)	27



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

13.2.9 Colture di arricchimento	29
13.3 Estrazione degli acidi nucleici	29
13.4 Multiplex real-time PCR	30
13.4.1 Preparazione della mix di reazione (Master mix Qiagen Quantitect multiplex Real-Time PCR)	30
13.5 - Isolamento delle colonie pure di clostridi produttori di tossine botuliniche - Parte opzionale	32
13.5.1 Selezione e purificazione delle colonie tipiche	33
13.5.2 Conferma della presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nelle colonie tipiche	33
13.6 Identificazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche	34
14. CONVALIDA DEI RISULTATI	34
15. ESPRESSIONE DEI RISULTATI	34
16. CONTROLLI DI QUALITÀ	35
17. RIESAME DELLA VALIDAZIONE	35
18. ARCHIVIAZIONE E CONSERVAZIONE	35
19. DESTINATARI	35
Appendice 1	36
Appendice 2 Curve di amplificazione dei controlli positivi di PCR	37



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente metodo di prova descrive le modalità seguite per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche in campioni alimentari, mangimi, campioni biologici (feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti, organi interni), campioni ambientali e colture di arricchimento, mediante multiplex real-time PCR. Per gli scopi del metodo si ricercano i geni che codificano per le tossine botuliniche tipo A, tipo B, tipo E e tipo F (principalmente responsabili del botulismo umano) e i geni che codificano per le tossine botuliniche tipo C, tipo D e le loro varianti mosaico CD e DC (responsabili del botulismo animale). Questo metodo individua i geni e non le tossine, quindi un risultato positivo non significa necessariamente la presenza di queste tossine nel campione esaminato.

I materiali idonei per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche sono le feci, i lavaggi intestinali, i tamponi rettali, il contenuto gastrico, l'alimento sospetto e i tessuti da toelettatura della ferita e gli organi interni. A volte anche i campioni ambientali possono essere utili per stabilire la fonte probabile di infezione (es. casi di botulismo infantile, casi di botulismo da ferita in tossicodipendenti, casi di botulismo animale).

I campioni da analizzare devono essere conformi ai criteri per l'accettazione dei conferimenti stabiliti dalla **PGCPSS01**; in particolare i campioni destinati alla ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche dovrebbero pervenire in laboratorio in condizioni di refrigerazione; comunque la temperatura non è un parametro critico ai fini dell'esito analitico.

2. RIFERIMENTI

Per tutti i documenti di seguito elencati si fa riferimento all'ultima revisione.

CNRB30 "Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche".

CDC, *Botulism Manual – Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers*. Atlanta, GA, Centers for Diseases Control and Prevention, 1998, pp. 15-21.

AOAC Official Method 977.26, *Clostridium botulinum and its toxins in foods*. Bacteriological Analytical Manual online. Chapter 17 *Clostridium botulinum*. <http://www-cfsan.fda.gov/>



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

ISO 7218 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche.

UNI EN ISO/IEC 17025 - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura.

UNI EN ISO 11133 Microbiologia di alimenti, mangimi per animali e acqua. Preparazione, produzione, immagazzinamento e prove di prestazione dei terreni colturali.

ISO/TS 17919 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia.

UNI EN ISO 8655-2 Apparecchiature volumetriche a pistone – Parte 2: pipette a stantuffo. + Errata Corrige.

ISO 20837 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti - Requisiti per la preparazione del campione per la ricerca qualitativa.

ISO 20838 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti - Requisiti per l'amplificazione e la ricerca per metodi qualitativi.

ISO 22174 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti - Requisiti generali e definizioni.

ISO 22118 Microbiology of food and animal stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Performance characteristics of molecular detection methods.

ISO 22119 Microbiology of food and animal stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions.

Locked Nucleic Acid technology. <http://www.exiqon.com/lna-technology>.

PGGDSP01 “Gestione della documentazione”.

PGRMSP01 “Redazione metodi di prova”.

PGGASP01 “Gestione delle apparecchiature”.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

PGCPSP01 "Gestione campioni e pratiche".

POQTBM1 "Preparazione, sterilizzazione e controllo di qualità dei terreni e dei materiali destinati alla microbiologia".

POQMSP01 "Controllo di qualità interno".

POMRBM01 "Gestione materiali di riferimento".

POVDBM01 "Validazione dei metodi di prova – Biologia molecolare"

PGVDSP 01 "Validazione metodi di prova".

Decreto Legislativo n. 26 del 14 marzo 2014 "Attuazione della Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici".

3. TERMINI E DEFINIZIONI

Per gli scopi di questo documento, si applicano i seguenti termini e definizioni:

3.1 Clostridi produttori di tossine botuliniche

Microrganismi anaerobi sporigeni, appartenenti al genere *Clostridium*, in grado di produrre tossine botuliniche in determinate condizioni ambientali. Attualmente fanno parte di questa classe di microrganismi, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* produttore di tossina botulinica tipo E, *Clostridium baratii* produttore di tossina botulinica tipo F.

I ceppi produttori di tossine botuliniche tipo A, B, E, F sono principalmente correlati al botulismo umano. I ceppi produttori di tossine tipo C e D sono correlati al botulismo animale. *C. botulinum* tipo G è stato associato al momento soltanto ad un caso di botulismo da ferita nell'uomo.

3.2 *Clostridium botulinum*

Batterio anaerobio sporigeno con spora in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare che, in determinate condizioni ambientali è in grado di produrre tossine botuliniche tipo A, B, C, D, E, F, G, H.

I ceppi di *C. botulinum* tipo C e D responsabili del botulismo animale hanno esigenze di anaerobiosi più stringenti rispetto ai ceppi responsabili del botulismo umano (tipo A, B, E, F, G e H), per cui per una loro coltivabilità ideale è necessario pre-ridurre i terreni colturali lasciandoli in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni prima dell'utilizzo.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

3.3 Tossine botuliniche

Proteine termolabili, solubili in fase acquosa, in grado di provocare la sindrome neuroparalitica del botulismo nell'uomo e in molte specie animali. Attualmente sono state identificate 7 varianti antigeniche di tossine botuliniche che vengono classificate con le lettere dell'alfabeto dalla A alla G. È stata identificata anche un'ottava variante, indicata con la lettera H, scaturita da un riarrangiamento genomico delle tossine tipo A e F. Sono responsabili del botulismo umano le tossine tipo A, B, E, F. Le tossine tipo C e D sono generalmente associate al botulismo animale. La tossina tipo G è stata al momento associata soltanto ad un caso di botulismo da ferita. Per quanto riguarda il botulismo animale è stata osservata una certa correlazione fra specie animale e tipo di tossina. Nei bovini la maggior parte dei focolai è correlata alla tossina tipo D, anche se sono riportati in letteratura focolai dovuti alle tossine tipo B, C, A. Nei cavalli la tossina più frequentemente responsabile del botulismo è il tipo B. Negli uccelli e negli animali da pelliccia è più frequente il rinvenimento di tossina tipo C. Nei pesci e in alcune specie di uccelli che si cibano di pesce si ritrova tossina tipo E.

I geni codificanti per le tossine botuliniche tipo C e tipo D, sono veicolati da batteriofagi lisogenici, che facilmente possono essere persi durante le procedure di laboratorio rendendo i microrganismi non tossigeni. Le tossine espresse da questi geni fagici possono ricombinare tra loro e determinare i cosiddetti mosaici. Il mosaico tipo CD è costituito da 2/3 di tossina tipo C e 1/3 di tossina tipo D; il mosaico tipo DC è costituito da 2/3 di tossina tipo D e 1/3 di tossina tipo C. I mosaici sembrano esercitare una tossicità maggiore rispetto alle loro varianti non mosaico.

3.4 Botulismo

Sindrome neuroparalitica causata dall'azione delle tossine botuliniche. Si manifesta come una paralisi flaccida, simmetrica, discendente, che può colpire l'uomo e molte specie animali. Sono state identificate diverse forme:

- botulismo alimentare, provocato dall'ingestione di tossine botuliniche preformate negli alimenti;
- botulismo infantile, provocato dalle tossine botuliniche prodotte *in situ* dai clostridi produttori di tossine botuliniche che in determinate condizioni possono colonizzare temporaneamente il tratto intestinale di lattanti con età inferiore ad un anno;
- botulismo intestinale dell'adulto, si presenta in adulti e ragazzi con le stesse caratteristiche del botulismo infantile;
- botulismo da ferita, provocato dalla infezione di una ferita da parte di *Clostridium botulinum*;
- botulismo iatrogeno, provocato dall'erroneo utilizzo delle tossine botuliniche per scopi terapeutici o cosmetici.

Il botulismo alimentare e quello da ferita sono comuni sia all'uomo che agli animali. In alcune specie animali sono state identificate forme tossinfettive che presentano lo stesso



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

meccanismo patogenetico del botulismo infantile e da colonizzazione intestinale dell'adulto.

3.5 Campioni biologici

I campioni biologici da analizzare in caso di botulismo possono differire a seconda della forma della malattia e dello stato del paziente. Generalmente si analizzano feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti, organi interni.

3.6 Alimenti acidi o acidificati

Gli alimenti acidi sono tutti quegli alimenti che naturalmente hanno un valore di pH minore di 4.6. Sono invece definiti alimenti acidificati tutti quegli alimenti che vengono acidificati per aggiunta di sostanze acide (aceto, correttori di acidità) fino al raggiungimento di un pH minore o uguale ai 4.6.

Gli insilati per uso zootecnico sono generalmente acidificati.

3.7 Geni bonts

I geni *bonts* sono i geni che codificano per le tossine botuliniche. Per ogni tipo di tossina botulinica è stato identificato uno specifico gene, conservato in tutte le specie che possono produrre quel tipo di tossina botulinica.

3.8 Estrazione del DNA

Procedura che permette la liberazione del DNA dal campione da esaminare.

3.9 Multiplex real-time PCR

Procedura enzimatica che permette: i) l'amplificazione *in vitro* del DNA, utilizzando contemporaneamente più paia di primers e sonde marcate con opportuni fluorofori; ii) la determinazione dei prodotti di PCR durante l'amplificazione.

3.10 Primer

Oligonucleotide di definita lunghezza e sequenza complementare al segmento di DNA analiticamente rilevante.

3.11 Sonda a idrolisi

Oligonucleotide di definita lunghezza e sequenza complementare al segmento di DNA analiticamente rilevante, disegnata in una regione interna al segmento di DNA amplificato dai primers. La sonda è marcata con due molecole denominate reporter e quencher che sono posizionate rispettivamente alle estremità 5' e 3' della stessa. Per azione della polimerasi, quencher e reporter vengono idrolizzati producendo un incremento di fluorescenza. Tale incremento di fluorescenza è direttamente proporzionale al numero di molecole di template presenti nella reazione e può essere determinata in tempo reale. I



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

reporters utilizzati nella presente PO sono indicati al successivo punto 5.1. Per gli scopi di cui alla presente PO, alcune delle basi nucleotidiche delle sonde a idrolisi utilizzate sono LNATM.

3.12 Basi LNATM

Le basi LNATM sono basi azotate contenenti come zucchero pentoso ribosio modificato (<http://www.exiqon.com/lna-technology>). L'utilizzo di tali basi nella sequenza di primers e sonde, permette un aumento della temperatura di melting dell'oligonucleotide, agevolando l'analisi mediante PCR, di genomi poveri di CG.

3.13 Template

DNA che deve essere amplificato.

3.14 Controllo positivo di PCR

Reazione di PCR contenente come template il DNA estratto da una brodocoltura di un ceppo che contiene il gene target.

3.15 Controllo negativo di PCR

Reazione di PCR contenente come template il DNA estratto da una brodocoltura di un ceppo che non contiene il gene target. Nel caso di una multiplex real-time PCR ogni controllo positivo per un gene funziona anche da controllo negativo per gli altri geni.

3.16 No template control

Reazione di PCR contenente come template acqua per PCR.

3.17 Controllo di Processo (CP)

Il controllo di processo viene utilizzato per monitorare il processo di PCR partendo dall'estrazione degli acidi nucleici. A questo scopo, un'opportuna quantità di una coltura del microrganismo utilizzato come CP, viene addizionata alla porzione di brodocoltura del campione da esaminare su cui viene effettuata l'estrazione degli acidi nucleici.

3.18 Controllo positivo di CP

Reazione di PCR contenente come template il DNA estratto dalla coltura del microrganismo utilizzato come CP.

3.19 Background

Livello di fluorescenza intrinseca risultante dai reagenti e dal materiale consumabile utilizzati.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

3.20 Linea di base

Livello di determinazione o punto in cui una reazione emette un'intensità di fluorescenza maggiore del background.

3.21 Ciclo soglia (Ct)

Punto della curva di amplificazione al quale il segnale di fluorescenza supera la linea di base.

4. ABBREVIAZIONI

BM	Biologia molecolare e microbiologia (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)
CNRB	Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo
DD	Direttore del Dipartimento
DR	Direttore di Reparto
PO	Procedura Operativa
PTP	Personale Tecnico abilitato all'esecuzione di attività di prova
RAF	Referente area funzionale
RAQ	Responsabile Assicurazione Qualità
RSA	Responsabile Settore Analitico
SM	<u>Reparto Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare – One Health MTA</u> (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)
SP	<u>Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria</u> (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)

5. RESPONSABILITÀ

Il personale tecnico abilitato all'esecuzione del metodo di prova per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR, è responsabile dell'esecuzione della prova, nonché dei dati grezzi, delle registrazioni sul foglio di lavoro, e delle osservazioni.

Il RSA è responsabile della verifica dell'intero procedimento analitico, dei risultati analitici ottenuti, della verifica della loro corretta trascrizione nel rapporto di prova.



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

6. NORME DI IGIENE E SICUREZZA

Le norme di igiene e sicurezza di seguito riportate, sono quelle espresse nel “CDC botulism manual”. L’agente eziologico di tutte le forme di botulismo è la tossina botulinica. Minime quantità di tossina assunte per ingestione, inalazione o per assorbimento attraverso la congiuntiva o una ferita possono causare grave intossicazione e morte. Per questo motivo, tutti i campioni sospettati di contenere tossine botuliniche devono essere manipolati con cautela e solamente da personale appositamente addestrato.

C. botulinum e altri clostridi produttori di tossine botuliniche finora identificati appartengono alla classe di rischio II ed agiscono attraverso la produzione di tossine. Tutte le operazioni relative ai passaggi colturali devono essere pertanto svolte indossando obbligatoriamente il camice, i guanti ed eventualmente occhiali di protezione o visiera. È necessario da parte dell’operatore particolare attenzione nel togliere i guanti al momento della sospensione del lavoro e nell’ indossarli al momento dell’avvio o della ripresa delle attività. Sia prima che al termine delle prove, l’operatore provvede al lavaggio delle mani con il sapone disinfettante in uso presso il laboratorio. In caso di sversamento di materiale sospettato di contenere tossina botulinica, questa può essere neutralizzata usando una soluzione 0.1M di idrossido di sodio. I clostridi produttori di tossine botuliniche vengono neutralizzati da una soluzione di ipoclorito di sodio (1 g/litro di cloro disponibile) per un tempo di contatto di 15-20 minuti o altro idoneo disinfettante. Per sversamenti di sangue o grandi quantità di materiale organico si raccomanda l’utilizzo di una soluzione di ipoclorito di sodio contenente 5 g/litro di cloro disponibile. Se il materiale sgocciolato contiene sia il microrganismo che la tossina si devono usare in sequenza sia l’ipoclorito di sodio che l’idrossido di sodio.

7. APPARECCHIATURE

7.1 Anse sterili;

7.2 Autoclave in grado di raggiungere la temperatura di 121°C;

7.3 Bagnomaria settato a 56°C ±1°C e a 70°C ±1°C oppure idoneo strumento con capacità equivalenti;

7.4 Bilancia tecnica;

7.5 Buste sterili per stomacher a battuta;

7.6 Cappe per DNA-RNA;

7.7 Centrifuga in grado di raggiungere almeno 12000 x g;

7.8 Congelatore < -18 °C;

7.9 Frigoriferi settati a + 3°C ± 2°C e a + 5°C ± 3°C;

7.10 Giare per anaerobiosi o idoneo apparato per l’incubazione in condizioni di anaerobiosi;

7.11 Igrometro per la misurazione della water activity oppure altra tipologia di strumento idoneo per la misurazione dalla water activity;

7.12 Incubatore a 30°C ±1°C;

7.13 Incubatore a 37 °C ±1°C;



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

7.14 Micropipette di differente volume nominale da 10 µl a 1000 µl con specifiche conformi alla norma UNI EN ISO 8655;

7.15 Microscopio ottico con obiettivo per immersione 100x e oculari 10x;

7.16 pH metro;

7.17 Piastre di Petri con diametro di 90 mm;

7.18 Pipette graduate sterili;

7.19 Provette da batteriologia;

7.20 Provette da batteriologia col tappo a scatto (da 5ml);

7.21 Provette per real-time PCR da 0,2 ml oppure piastre per real-time PCR;

7.22 Provette tipo Eppendorf da 1.5 ml e 2 ml;

7.23 Puntali sterili con filtro;

7.24 Stomacher a battuta oppure idoneo strumento con capacità equivalenti;

7.25 Termoblocco riscaldato a 99°C ±1°C;

7.26 Termociclatore per real-time PCR equipaggiato con i filtri per i fluorofori FAM, HEX, ROX, CY5, Alexa350, oppure equipaggiato con i filtri per i fluorofori FAM, HEX, ROX, CY5, CY5.5.

7.27 Sistema di filtrazione per acqua;

8. MATERIALI

Tutti i reagenti sono da intendersi del grado di purezza PA.

8.1 Acqua distillata;

8.2 Acqua penta-distillata sterile o acqua sterile per PCR;

8.3 Agar batteriologico;

8.4 Alcol etilico assoluto;

8.5 Alcol etilico denaturato;

8.6 Amido solubile;

8.7 Carbonato di calcio;

8.8 Chelex-100;

8.9 Cisteina;

8.10 Cloruro di sodio;

8.11 Cooked meat medium;

8.12 Diidrogeno fosfato di sodio;

8.13 Egg Yolk emulsion;

8.14 Estratto di lievito;

8.15 Gelatina;

8.16 Glucosio;

8.17 Idrogeno fosfato di sodio;

8.18 Peptone;

8.19 Primer ANI_C_f;



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

- 8.20 Primer ANI_C_r;
- 8.21 Primer ANI_D_f;
- 8.22 Primer ANI_D_r;
- 8.23 Primer ANI_CD_f;
- 8.24 Primer ANI_CD_r;
- 8.25 Primer ANI_DC_f;
- 8.26 Primer ANI_DC_r;
- 8.27 Primer ANI_CP_f;
- 8.28 Primer ANI_CP_r;
- 8.29 Primer FABO3_Af;
- 8.30 Primer FABO3_Ar;
- 8.31 Primer FABO3_Bf;
- 8.32 Primer FABO3_Br;
- 8.33 Primer FABO3_Ef;
- 8.34 Primer FABO3_Fr;
- 8.35 Primer FABO4_gyrB_f;
- 8.36 Primer FABO4_gyrB_r;
- 8.37 QuantiTect multiplex no Rox kit (Qiagen);
- 8.38 Solfato di ammonio;
- 8.39 Solfato di magnesio;
- 8.40 Sonda ANI_C_p;
- 8.41 Sonda ANI_D_p;
- 8.42 Sonda ANI_CD_p;
- 8.43 Sonda ANI_DC_p;
- 8.44 Sonda ANI_CP_p.
- 8.45 Sonda FABO3_Ap;
- 8.46 Sonda FABO3_Bp;
- 8.47 Sonda FABO3_Fp;
- 8.48 Sonda FABO4_gyr_P;
- 8.49 Triptone;
- 8.50 Tween 80 (polisorbato).

9. MATERIALI DI RIFERIMENTO

Per gli scopi di cui alla presente PO si utilizzano i seguenti ceppi di riferimento:

- *C. botulinum* tipo A (CRB collezione n. CL458)
- *C. botulinum* tipo B (CRB collezione n. CL425)
- *C. butyricum* tipo E (CRB collezione n. CL21)
- *C. botulinum* tipo F (CRB collezione n. CL461)
- *C. botulinum* non tossigeno (CRB collezione n. CL14 n.t.).
- *C. botulinum* tipo C (CRB collezione n. CL672)



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

- *C. botulinum* tipo D (CRB collezione n. CL673)

I ceppi di cui sopra fanno parte della collezione dei ceppi di clostridi produttori di tossine botuliniche del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo.

Le modalità di conservazione in microbank, rivitalizzazione e il controllo di qualità dei ceppi di cui sopra, sono effettuate in conformità alle prescrizioni riportate nella **POMRBM01**.

Per gli scopi di cui alla presente PO, i ceppi di riferimento vengono utilizzati per l'estrazione del DNA da utilizzare come controllo positivo di PCR. Inoltre, una porzione della coltura del ceppo di *C. botulinum* non tossigeno (CRB collezione n. CL14 n.t.) viene utilizzata come CP ed aggiunta ad ogni campione da testare mediante multiplex real-time PCR.

9.1 Preparazione dei controlli positivi di PCR

Il DNA estratto da tutti i ceppi di riferimento di cui sopra, viene utilizzato come *template* per i controlli positivi di PCR. A tale fine prelevare sterilmente una microsfera dalla microbank utilizzata per la conservazione del ceppo e seminare in provetta per batteriologia contenente 9 ml di terreno TPGY sterile.

Incubare la provetta di TPGY seminato alla temperatura di 30°C ± 1°C per 24 h ± 2h in condizioni di anaerobiosi.

Prelevare sterilmente 1 ml della coltura e seguire le indicazioni riportate al successivo punto 13.3 "Estrazione degli acidi nucleici".

Diluire 1:100 il DNA estratto in acqua penta-distillata sterile o in acqua per PCR sterile, quindi omogeneizzare la soluzione, aliquotare 10 µl di DNA/provetta e congelare le aliquote a temperatura inferiore a -18°C. Per aliquotare i controlli positivi di PCR utilizzare le provette tipo Eppendorf da 0.2 ml sterili precedentemente contrassegnate con le informazioni di cui sotto. I controlli positivi così aliquotati possono essere conservati per un periodo di 5 anni.

Non ricongelare né conservare eventuali eccedenze dell'aliquota scongelata.

Le provette contenenti il DNA estratto dai ceppi di riferimento, devono riportare sul tappo la scritta (effettuata con pennarello vetrografico) C+ <tipo di tossina o gene> + <numero progressivo di identificazione>.

Conservare le varie aliquote all'interno di un'apposita scatola di plastica in cui sul coperchio sono riportate le seguenti informazioni: indicazione del ceppo di riferimento, data di rigenerazione, data di preparazione delle aliquote, data di scadenza, volume di ogni aliquota, e i numeri progressivi di identificazione della prima e dell'ultima aliquota

9.2 Preparazione del Controllo di Processo

Per la preparazione del CP viene utilizzata una coltura di 4 giorni del ceppo di *C. botulinum* non tossigeno (CRB collezione n. CL14 n.t.). A questo scopo prelevare



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

sterilmente una microsfera dalla microbank utilizzata per la conservazione del ceppo e seminare in provetta per batteriologia contenente 9 ml di terreno TPGY sterile.

Incubare la provetta di TPGY seminato alla temperatura di $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per $96 \text{ h} \pm 2\text{h}$ in condizioni di anaerobiosi.

Terminato il periodo di incubazione centrifugare la brodocoltura a 3500 rpm per 15 min e scartare il sovrantante. Lavare il pellet 2 volte con acqua penta-distillata sterile o con acqua per PCR sterile, quindi risospendere il pellet in 9 ml di acqua distillata sterile o in acqua per PCR sterile. Effettuare opportune diluizioni decimali della coltura, quindi prelevare da ogni diluizione effettuata 100 μl di sospensione ed estrarre il DNA come indicato al successivo punto 13.3 "Estrazione degli acidi nucleici".

Testare il DNA estratto da ogni diluizione effettuata, applicando la seguente PO. Scegliere come sospensione di lavoro la diluizione che genera un Ct con valore compreso fra 30 e 33. Aliquotare la sospensione di lavoro in provette da batteriologia col tappo a scatto sterili contrassegnate con le informazioni di cui sotto, in modo da ottenere un volume idoneo per l'analisi di 25 campioni, quindi congelare a temperatura inferiore a -18°C . Il CP così aliquotato può essere conservato per un periodo di 5 anni.

Non ricongelare né conservare eventuali eccedenze dell'aliquota scongelata.

Le provette contenenti il CP devono contenere sul tappo la scritta CP (effettuata con pennarello vetrografico) e il numero progressivo di identificazione.

Conservare le varie aliquote all'interno di un'apposita scatola di plastica in cui sul coperchio sono riportate le seguenti informazioni: indicazione del ceppo di riferimento, data di rigenerazione, data di preparazione delle aliquote, data di scadenza, volume di ogni aliquota, e i numeri progressivi di identificazione della prima e dell'ultima aliquota seguite dal numero totale di aliquote.

10. PREPARAZIONE TERRENI E REAGENTI

10.1 *Tryptone Peptone Glucose Yeast extract (TPGY)*

10.1.1 Composizione del terreno

Tryptone	g 50
Peptone	g 5
Estratto di lievito	g 20
Glucosio	g 4
Acqua distillata	ml1000



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

10.1.2 Preparazione

Dissolvere in idoneo contenitore di vetro tipo Pirex gli ingredienti usando acqua distillata. Se necessario, aliquotare 9 ml di terreno in provette per batteriologia. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale del terreno 7.0 ± 0.2. Conservare il terreno sterilizzato in frigorifero a + 5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

10.2 *Tryptone Peptone Glucose Yeast extract tamponato (TPGY tamponato)*

10.2.1 Composizione della base

Tryptone	g 50
Peptone	g 5
Estratto di lievito	g 20
Glucosio	g 4

10.2.2 Composizione del tampone

10.2.2.1 Soluzione A. Dissolvere 138 g di diidrogeno fosfato di sodio (NaH₂PO₄) in 1000 ml di acqua distillata.

10.2.2.2 Soluzione B. Dissolvere 142 g di idrogeno fosfato di sodio (Na₂HPO₄) in 1000 ml di acqua distillata.

10.2.2.3 Composizione del tampone. A 250 ml della soluzione A, aggiungere goccia a goccia la soluzione B finché il pH finale del tampone non raggiunga il valore di 7.2 ± 0.2.

10.2.3 Preparazione del TPGY tamponato

Dissolvere i componenti della base in 500 ml di acqua distillata, utilizzando un idoneo contenitore di vetro tipo Pirex. Aggiungere 100 ml del tampone di cui al punto 7.2.2.3, quindi portare al volume finale di un litro aggiungendo acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale del terreno 7.2 ± 0.2. Conservare il terreno sterilizzato in frigorifero a +5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

10.3 *Egg Yolk Agar (EYA)*

10.3.1 Composizione del terreno

Tryptone	g 5
Peptone	g 20
Estratto di lievito	g 5
NaCl	g 5
Agar batteriologico	g 20
Acqua distillata	ml 1000
Egg Yolk emulsion	ml 80



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

10.3.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare il terreno alla temperatura di 45-50 °C. Aggiungere sterilmente 80 ml di Egg Yolk emulsion, quindi distribuire in piastre di Petri sterili. pH finale del terreno 7.0 ± 0.2. Conservare le piastre in frigorifero a +5 °C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

10.4 Tampone Fosfato Gelatina

10.4.1 Composizione del Tampone Fosfato Gelatina

Gelatina	g 2
Idrogeno fosfato di sodio	g 4
Acqua distillata	ml 1000

10.4.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il tampone in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale 6.2 ± 0.2. Conservare il tampone in frigorifero a +5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

10.5 Cooked Meat Fortificato (CMF)

10.5.1 Composizione del terreno

Cooked Meat Medium	g 1.25
Amido solubile	g 0.01
Estratto di lievito	g 0.1
Carbonato di calcio	g 0.05
Solfato di ammonio	g 0.1
Glucosio	g 0.08
Cisteina	g 0.01
Acqua distillata	ml 10

10.5.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale 7.6 ± 0.2. Conservare il terreno sterilizzato in frigorifero a + 5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

Prima dell'uso è preferibile mantenere il terreno in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

10.6 McClung Toabe Medium (MCTM)

10.6.1 Composizione del terreno

Triptone	g 40
Estratto di lievito	g 5.0
Agar batteriologico	g 20.0
Cloruro di sodio	g 2.0
Glucosio	g 2.0
Idrogeno fosfato di sodio	g 5.0
Soluzione al 5% di solfato di magnesio	ml 0.2
Acqua distillata	ml 900
Egg Yolk emulsion	ml 100

10.6.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare il terreno alla temperatura di 45-50 °C. Aggiungere sterilmente 80 ml di Egg yolk emulsion, quindi distribuire in piastre di Petri sterili. pH finale del terreno 7.4 ± 0.2. Conservare le piastre in frigorifero a + 5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane. Prima dell'uso è preferibile mantenere il terreno in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

10.7 Soluzione Acqua + Tween 80

10.7.1 Composizione

Tween 80 (polisorbato 80)	g 10
Acqua distillata	ml 1000

10.7.2 Preparazione

Dissolvere il Tween 80 in acqua distillata e sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Conservare il tampone per non oltre 4 settimane.

10.8 Chelex 100 (sospensione per l'estrazione degli acidi nucleici)

Il metodo di cui alla presente Procedura Operativa è stato standardizzato estraendo il DNA con una sospensione al 6% di Chelex 100.

10.8.1 Preparazione

Aggiungere 6 g di Chelex-100 a 100 ml di acqua penta distillata sterile o acqua sterile per PCR, in bottiglia contenente un magnetino utilizzato per facilitare l'omogenizzazione della



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

sospensione durante le fasi di prelievo della quantità necessaria per l' estrazione. Conservare al riparo da fonti di luce e alla temperatura di + 5 °C ± 3°C per non oltre 6 mesi.

10.9 Master mix per real-time PCR (aliquotazione e modalità di conservazione/utilizzo)

Il metodo di cui alla presente Procedura Operativa è stato standardizzato con la master mix Qiagen QuantiTect multiplex PCR no Rox kit (1000).

Prima del primo utilizzo, scongelare e omogeneizzare le master mix. Aliquotare 400 µl di master mix in provette tipo Eppendorf da 1.5 ml sterile, precedentemente contrassegnata con le informazioni di cui sotto. Congelare le aliquote a temperatura inferiore a -18°C e conservare fino alla scadenza naturale indicata dal produttore per il prodotto integro.

Le provette tipo Eppendorf da 1.5 ml contenenti ciascuna 400 µl di master mix devono riportare sul tappo la scritta (effettuata con pennarello vetrografico) qPCR – MMix e il numero progressivo di identificazione, secondo quanto indicato nella PG Gestione materiali e reagenti. Conservare le varie aliquote all'interno di un'apposita scatola di plastica in cui sul coperchio sono riportate le seguenti informazioni: denominazione completa della master mix, produttore, n. di catalogo del produttore, n. di lotto di produzione, data di arrivo, data di preparazione delle aliquote, data di scadenza, volume di ogni aliquota, e i numeri progressivi di identificazione della prima e dell'ultima aliquota seguite dal numero totale di aliquote.

È possibile conservare alla temperatura di 3°C ± 2°C, per un periodo non superiore a 15 giorni, eventuali porzioni di master mix in eccesso. in tal caso indicare sulla provetta la data di scongelamento e la data entro la quale deve essere consumata. Oltrepassato questo periodo, eliminare l'eccedenza.

10.10 Primers

Primers per l'amplificazione dei geni codificanti per le tossine botuliniche responsabili del botulismo umano

Gene	Nome	Sequenza (5'- 3')	Posizione	GeneBank Acc. No.	Conc. finale
<i>bont/A</i>	FABO3_Af	gct ata ata aac tat cag tat aat c	884267 - 884291	NC009697	600 nM
	FABO3_Ar	taa gtt tcg aac tta aat cat c	884333 - 884354		600 nM
<i>bont/B</i>	FABO3_Bf	gct ctc aac agt taa tac tc	2112 - 2131	GQ244311	600 nM

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

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

	FABO3_Br	ttt att att tct tcc aat gct tg	2182 - 2204		600 nM
bont/E	FABO3_Ef	aaa ata cat taa gtt cat taa cat c	1172849 - 1172873	NC010723	600 nM
	FABO3_Er	atg atg ctt ata tac caa aat	1172909 - 1172929		600 nM
bont/F	FABO3_Ff	gct tag gtc aaa tta tag tta tg	1172849 - 1172871	NC010723	600 nM
	FABO3_Fr	ccc att att gtt ttg aaa att c	1172998 - 1172929		600 nM
4gyrB	FABO4_gyrB_f	att aca tca aca acc tat ata tg	5141 - 5263	CP000939.1	600 nM
	FABO4_gyrB_r	cat aac cat cgt tat att g	5205 - 5224		600 nM

Primers per l'amplificazione dei geni codificanti per le tossine botuliniche responsabili del botulismo animale

Gene	Nome	Sequenza (5'- 3')	Posizione	GeneBank Acc. No.	Conc. finale
bont/C	ANI_C_f	cta cgt tta aat taa cta ac	76176-76195	AP008983	200 nM
	ANI_C_r	ggt gat att gaa att att g	76233-76251		200 nM
bont/D	ANI_D_f	cag gaa att ttg ttg taa	8745-8762	AB745669	300 nM
	ANI_D_r	cga aga ata aac aac ttc	8813-8830		300 nM
bont/CD	ANI_CD_f	aca gga tat aca aat aaa tg	2998-3017	FN436022	600 nM
	ANI_CD_r	cct cat cta aat ctt caa	3098-3115		600 nM
bont/DC	ANI_DC_f	gtt cgt tta taa tac aac c	3620-3638	EF378947	600 nM
	ANI_DC_r	cca agt ttg aaa cta taa c	3725-3743		600 nM
4gyrB	ANI_CP_f	agc agt tat ttc agt aaa	5396-5413	CP000939	600 nM
	ANI_CP_r	cac cat ttc cta att ttg	5449-5466		600 nM

Prima del primo utilizzo, rigenerare i primers liofilizzati utilizzando acqua penta distillata sterile oppure acqua per PCR sterile, in modo da ottenere una concentrazione di 100 µM (seguendo le indicazioni riportate nel report di sintesi). Diluire in una stessa provetta tipo Eppendorf il primer senso e il primer antisenso in modo da ottenere la concentrazione finale di 50 µM, omogeneizzare ed aliquotare in provette tipo Eppendorf da 0.2 ml sterili, precedentemente contrassegnate con le informazioni di cui sotto, in modo da ottenere un volume idoneo per l'analisi di 25 campioni, quindi congelare a temperatura inferiore a -18°C. I primers così aliquotati possono essere conservati per un periodo di 5 anni.

Non ricongelare né conservare eventuali eccedenze dell'aliquota scongelata.

Le provette contenenti i primers devono riportare sul tappo la scritta (effettuata con pennarello vetrografico) Prim/<tipo di tossina o gene> e il numero progressivo di identificazione seguite dal numero totale di aliquote.

Conservare le varie aliquote all'interno di un'apposita scatola di plastica in cui sul coperchio sono riportate le seguenti informazioni: denominazione completa dei primers, produttore, ditta che ha effettuato la sintesi, n. di lotto di produzione, data di arrivo, data di preparazione delle aliquote, data di scadenza, volume di ogni aliquota, e i numeri progressivi di identificazione della prima e dell'ultima aliquota.

**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E****SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA****AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA****CNRB31.010****METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR****REV. 0****10.11 Sonde**

Sonde per l'amplificazione dei geni codificanti per le tossine botuliniche responsabili del botulismo umano

Gene	Nome	Sequenza (5' - 3')*	Posizione	GeneBank Acc. No.	Conc. finale
bont/A	FABO3_Ap	HEX – tttTctCttCctCagTatat – BHQ1	884293-884312	NC009697	100 nM
bont/B	FABO3_Bp	FAM – cctTatAcaTtcCctCttt – BHQ1	2146-2164	GQ244311	100 nM
bont/E	FABO3_Ep	CY5 – ttcTatAtcActTgtTccatta – BHQ3	1172880 -1172901	NC010723	100 nM
bont/F	FABO3_Fp	Alexa350 – ttgTgcAatTatTtcCtatt – DDQ	1172877 - 1172996	NC010723	300 nM
4gyrB	FABO4_gyr_P	ROX – caaTctCaaCtaTacAtcCatc – BHQ2	5278 - 5299	CP000939.1	50 nM

*le basi indicate con la lettera maiuscola sono modificate LNA™.

Sonde per l'amplificazione dei geni codificanti per le tossine botuliniche responsabili del botulismo animale

Gene	Nome	Sequenza (5' - 3')*	Posizione	GeneBank Acc. No.	Conc. finale
bont/C	ANI_C_p	HEX – cacCaaAtcCttCttgtg – BHQ1	76209-76226	AP008983	200 nM
bont/D	ANI_D_p	FAM – acaTaaCatTagTcaagtct – BHQ1	8791-8810	AB745669	300 nM
bont/CD	ANI_CD_p	Cy5 – tcActCtgCttTaattct – BHQ3	3075-3093	FN436022	600 nM
bont/DC	ANI_DC_p	Alexa350 – tgaTagTatTccAagccta – BHQ1	3699-3717	EF378947	600 nM
4gyrB	ANI_CP_p	ROX – tgtCtgTccTtcAaattg – BHQ2	5427-5444	CP000939	600 nM

*le basi indicate con la lettera maiuscola sono modificate LNA™.

Prima del primo utilizzo, rigenerare le sonde liofilizzate utilizzando acqua penta distillata sterile oppure acqua per PCR sterile, in modo da ottenere una concentrazione di 100 µM (seguendo le indicazioni riportate nel report di sintesi). Mantenere il più possibile lontano dalla luce diretta. Diluire 1:10 le sonde rigenerate utilizzando acqua penta distillata sterile oppure acqua per PCR sterile ed aliquotare in provette tipo Eppendorf da 0.2 ml sterili, precedentemente contrassegnate con le informazioni di cui sotto, in modo da ottenere un volume idoneo per l'analisi di 25 campioni quindi congelare a temperatura inferiore a -18°C. Le sonde così aliquotate possono essere conservate per un periodo di 5 anni.

Le provette contenenti le sonde devono contenere sul tappo la scritta (effettuata con pennarello vetrografico) Sonda/<tipo di tossina o gene> e il numero progressivo di identificazione seguite dal numero totale di aliquote.

Non ricongelare né conservare eventuali eccedenze dell'aliquota scongelata.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

Conservare le varie aliquote a riparo dalla luce all'interno di un'apposita scatola di plastica in cui sul coperchio sono riportate le seguenti informazioni: denominazione completa delle sonde, produttore, ditta che ha effettuato la sintesi, n. di lotto di produzione, data di arrivo, data di preparazione delle aliquote, data di scadenza, volume di ogni aliquota, e i numeri progressivi di identificazione della prima e dell'ultima aliquota.

10.12 CP

Il protocollo descritto nella presente Procedura Operativa, prevede l'uso di un CP. A tal fine aggiungere 100 µl della sospensione di CP, preparato secondo quanto descritto al precedente punto 9.2, ad ogni porzione di coltura da testare mediante multiplex real-time PCR.

NOTA: I primers e la sonda per l'amplificazione del CP sono stati disegnati su una porzione del gene *gyrB*, di *C. botulinum* tipo B ceppo Okra (GeneBank accession number CP000939 region 4431...6344).

11. REQUISITI E MODALITÀ DI MANIPOLAZIONE/CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Tutti i campioni eccetto quelli provenienti da ferite, devono essere mantenuti in condizioni di refrigerazione alla temperatura di $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, preferibilmente non congelati, ed esaminati prima possibile. I campioni prelevati da ferite devono essere trasportati al laboratorio a temperatura ambiente ed in idonei contenitori. Gli alimenti dovrebbero pervenire in laboratorio possibilmente nel loro contenitore originale.

La quantità ideale di feci o lavaggio intestinale (enema) da prelevare (preferibilmente prima del trattamento con l'antitossina) è di 25-50 g e/o ml, anche se quantitativi minori di campione e prelievi effettuati dopo il trattamento con l'antitossina, hanno permesso la conferma dell'evento di botulismo e l'isolamento dell'agente eziologico. Nel caso di lavaggio intestinale dovrebbe essere utilizzata acqua sterile non batteriostatica. In considerazione del fatto che la stipsi è uno dei segni clinici maggiormente ricorrenti in casi di botulismo, è possibile analizzare anche i tamponi rettali (valido soltanto nel caso del botulismo umano). Per quanto riguarda gli alimenti, le confezioni sospette vanno inviate in laboratorio evitando il più possibile la manipolazione del loro contenuto. In ogni caso il quantitativo ideale per effettuare la ricerca completa di tossine botuliniche e di clostridi produttori di tossine botuliniche è almeno 50 g e/o ml. È comunque possibile analizzare confezioni contenenti tracce dell'alimento o del suo liquido di governo.

La quantità ideale di coltura di arricchimento da testare per la ricerca delle tossine botuliniche e dei clostridi produttori di tossine botuliniche è 10 ml.

Prima di aprire gli alimenti inscatolati, pulire il coperchio o la parte superiore della scatola con acqua e sapone, sciacquare, rimuovere l'eccesso di acqua e asciugare con una



CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

soluzione di alcol etilico al 70%. I contenitori con i fondelli deformati dovrebbero essere raffreddati prima dell'apertura e flambati con estrema cautela.

12. PRINCIPIO DEL METODO

Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche mediante:

- semina del campione da analizzare in idonei terreni colturali di arricchimento al fine di incrementare il numero di cellule di clostridi produttori di tossine botuliniche, per favorire la loro determinazione;
- estrazione degli acidi nucleici dalle colture di arricchimento, mediante lisi delle cellule batteriche;
- amplificazione degli acidi nucleici estratti, mediante determinazione simultanea dei geni che codificano per le tossine botuliniche secondo i due schemi di 5-plex real-time PCR sotto indicati:
 - *bont/A + bont/B + bont/E + bont/F + CP*;
 - *bont/C + bont/D + bont/CD + bont/DC + CP*.

Nel caso di analisi di campioni associati al botulismo umano seguire lo schema 1 di 5-plex real-time PCR. Nel caso di campioni associati al botulismo animale seguire lo schema 2 di 5-plex real-time PCR ed eventualmente anche lo schema n. 1, in funzione della specie animale coinvolta.

I differenti targets sopra riportati possono essere amplificati anche mediante schemi 3-plex e 2-plex, come specificato nella seguente tabella

3-plex	Target botulismo umano	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/A + bont/B + CP</i>• <i>bont/E + bont/F + CP</i>
	Target botulismo animale	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/C + bont/D + CP</i>• <i>bont/CD + bont/DC + CP</i>
2-plex	Target botulismo umano	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/A + CP</i>• <i>bont/B + CP</i>• <i>bont/E + CP</i>• <i>bont/F + CP</i>
	Target botulismo animale	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/C + CP</i>• <i>bont/D + CP</i>• <i>bont/CD + CP</i>• <i>bont/DC + CP</i>

In casi di estrema urgenza analitica è possibile analizzare i campioni oggetto del campo di applicazione del presente metodo senza effettuare la fase di arricchimento colturale. In questi casi i risultati devono essere attentamente valutati tenendo conto che il metodo può



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

determinare DNA libero e DNA proveniente da cellule morte. E' tuttavia necessario confermare il risultato ottenuto mediante il procedimento descritto al par. 13.

Parte opzionale: Isolamento di colonie pure e conferma della presenza dei geni codificanti per le tossine botuliniche secondo i due schemi di 5-plex real-time PCR sopra indicati.

13. DESCRIZIONE DEL PROCEDIMENTO

13.1 Tipologia di campione da sottoporre ad analisi

- Campioni alimentari;
- Mangimi;
- Campioni biologici (feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti e organi interni);
- Campioni ambientali
- Colture di arricchimento.

13.2 Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento

Aprire asetticamente il campione in una cappa di sicurezza biologica, oppure, in alternativa all'interno di una ampia busta di plastica per evitare la formazione di aerosol.

NOTA 1: *Può essere utile effettuare l'osservazione microscopica delle forme microbiche presenti nel campione da sottoporre ad analisi. I clostridi produttori di tossine botuliniche appaiono come bastoncelli sporigeni Gram positivi. Particolarmente importante risulta la posizione e la forma delle spore. C. botulinum appare come un bastoncello con spora debordante in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare, che assume la forma di una racchetta da tennis. C. butyricum appare come un bastoncello con spora non debordante in posizione centrale rispetto al corpo bastoncellare, che assume la forma di una spilla da balia. C. baratii appare come un bastoncello con spora non debordante in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare (appendice n. 1).*

13.2.1 Campioni alimentari e mangimi in porzione test da 25 g

Se si analizzano campioni riferibili al botulismo animale il terreno TPGY o TPGY tamponato deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

- A. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY tamponato facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria.
- B. Raffreddare fino alla temperatura di $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in bagnomaria.



CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

- C. Pesare 25 g \pm 2 g di campione in busta stomacher sterile ed aggiungere 225 ml di TPGY tamponato; omogeneizzare in stomacher (30 secondi a 230 rpm).
- D. Trattare termicamente il terreno seminato, in bagnomaria a 70°C \pm 1°C per 10 minuti, quindi raffreddare fino a temperatura ambiente (per rendere più veloce questo passaggio, il terreno inoculato può essere raffreddato in acqua o in bagno di acqua e ghiaccio).
- E. Incubare in condizioni di anaerobiosi alla temperatura di 30°C \pm 1°C per 24 h \pm 2h. Prelevare 1 ml della coltura di arricchimento (da porre in provette tipo Eppendorf da 2 ml) e reincubare per ulteriori 72 h \pm 2h. Se dopo 24 h \pm 2h la coltura non presenta crescita microbica (assenza di torbidità e di produzione di gas) protrarre l'incubazione per ulteriori 72 h \pm 2h (periodo di incubazione totale 4 giorni) a 30°C \pm 1°C in condizioni di anaerobiosi. Prelevare 1 ml da porre in provette tipo Eppendorf da 2 ml.
- F. Estrarre gli acidi nucleici dalla porzione di coltura prelevata, come descritto al punto 13.3.
- G. Qualora il risultato della multiplex real-time PCR dal brodo di arricchimento di 24 h \pm 2h fosse negativo, ripetere nuovamente l'estrazione degli acidi nucleici e la multiplex real-time PCR come descritto ai successivi punti 13.3 e 13.4, partendo da 1 ml della coltura di arricchimento incubata per 4 giorni complessivi,
- H. Se e solo se dopo 4 giorni di incubazione la coltura non presenta crescita microbica (assenza di torbidità e di produzione di gas) protrarre l'incubazione per ulteriori 8 giorni, quindi effettuare da 1 ml della coltura di arricchimento l'estrazione degli acidi nucleici e la multiplex real-time PCR, come descritto ai successivi punti 13.3 e 13.4. Dopo quest'ulteriore periodo di incubazione, in assenza di crescita microbica, il campione può essere considerato negativo senza necessità di effettuare ulteriori analisi.
- I. Per quanto riguarda i campioni alimentari, può essere utile eseguire la misurazione del pH e dell' a_w , in quanto a valori di pH minori di 4.6 e a_w minore di 0.935 i clostridi produttori di tossine botuliniche non sono in grado di crescere e produrre le tossine botuliniche. È altresì utile la valutazione dei caratteri organolettici dell'alimento.

13.2.2 Residui di campioni alimentari e mangimi

Se si analizzano campioni riferibili al botulismo animale il terreno TPGY deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

- A. Effettuare una sospensione campione/tampone fosfato gelatina in rapporto 1:1.
- B. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare in bagnomaria fino alla temperatura di 70°C \pm 1 °C.



CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

- C. Prelevare 2 ml della sospensione campione/tampone fosfato gelatina di cui sopra e seminare in 9 ml di TPGY. Se si dispone di un quantitativo inferiore a 2 ml, seminare l'intera sospensione campione/tampone fosfato gelatina.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-I del paragrafo 13.2.1.

13.2.3 Tamponi rettali

- A. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY mediante bollitura per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare in bagnomaria fino alla temperatura di 70°C ±1 °C.
- B. Seminare 1-2 tamponi rettali (in base alla quantità di campione depositata nel tampone stessi) in 9 ml di TPGY.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-H del paragrafo 13.2.1.

13.2.4 Lavaggi intestinali (enema)

Se si analizzano campioni riferibili al botulismo animale il terreno TPGY deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

- A. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY mediante bollitura per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare in bagnomaria fino alla temperatura di 70°C ±1 °C.
- B. Seminare 1-2 ml di campione in 9 ml di TPGY.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-H del paragrafo 13.2.1.

13.2.5 Campioni fecali, tessuti ed organi interni

Se si analizzano campioni provenienti da casi di botulismo animale il terreno TPGY deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

- A. Effettuare una sospensione campione/tampone fosfato gelatina in rapporto 1:1.
- B. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di 70°C ±1 °C in bagnomaria.
- C. Prelevare 2 ml della sospensione campione/tampone fosfato gelatina di cui sopra, e seminare in 9 ml di TPGY. Se si dispone di un quantitativo inferiore a 2 ml, seminare l'intera sospensione campione/tampone fosfato gelatina.

Proseguire secondo quanto descritto nei punti D-H del paragrafo 13.2.1.



CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

13.2.6 Essudato da ferita

Se si analizzano campioni provenienti da casi di botulismo animale il terreno TPGY deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

- Effettuare una sospensione campione/tampone fosfato gelatina in rapporto 1:1.
- Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in bagnomaria.
- Prelevare 2 ml della sospensione campione/tampone fosfato gelatina di cui sopra, e seminare in 98 ml di TPGY. Se si dispone di un quantitativo inferiore a 2 ml, seminare l'intera sospensione campione/tampone fosfato gelatina.

Proseguire secondo quanto descritto nei punti D-H del paragrafo 13.2.1.

È possibile analizzare anche garze e bende utilizzate per la toelettatura della ferita purché non contengano sostanze batteriostatiche o battericide. In questo caso le garze e/o le bende devono essere trattate come un normale campione seguendo le indicazioni riportate nei punti A-C.

13.3.7 Campioni disidratati

Se si analizzano campioni provenienti da casi di botulismo animale il terreno TPGY deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

- Effettuare una sospensione campione/tampone fosfato gelatina in rapporto 1:1.
- Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in bagnomaria.
- Pesare 2 g della sospensione campione/tampone fosfato gelatina di cui sopra, e seminare in 9 ml di TPGY. Se si dispone di un quantitativo inferiore a 2 g, seminare l'intera sospensione campione/tampone fosfato gelatina.

Proseguire secondo quanto descritto nei punti D-H del paragrafo 13.2.1.

13.3.8 Miele

- Porre il campione in bagnomaria settato a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti per fondere il miele. Mescolare il campione invertendo la confezione/contenitore.
- Pesare $25\text{ g} \pm 2\text{ g}$ di miele in un provettone da centrifuga sterile e aggiungere 50 ml della soluzione acqua + tween 80 preriscaldata a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se si dispone di un quantitativo di campione minore, dissolvere in una soluzione di acqua + tween 80 mantenendo le proporzioni 1:2. Mescolare fino a completa dissoluzione del campione.



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

- C. Centrifugare a 8000 x g per 30 minuti.
- D. Rimuovere con cura la fase liquida. Porre il deposito in frigorifero alla temperatura di $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- E. Filtrare la fase liquida con il sistema di filtrazione dell'acqua, utilizzando filtri tipo Millipore a disco con pori da $0.45\text{ }\mu\text{m}$. Se il filtro dovesse impaccarsi sostituirlo con uno nuovo.
- F. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in bagnomaria.
- G. Seminare il/i filtro/i in 9 ml di TPGY.
- H. Seminare il sedimento in 9 ml di TPGY.

Proseguire secondo quanto descritto nei punti D-H del paragrafo 13.2.1.

13.2.9 Colture di arricchimento

Per le colture di arricchimento procedere direttamente con l'estrazione degli acidi nucleici come indicato al successivo punto 13.3.

In presenza di quantitativi inferiori ad 1 ml di coltura di arricchimento procedere secondo quanto descritto al precedente punto 13.2.4.

13.3 Estrazione degli acidi nucleici

In una provetta tipo Eppendorf da 2 ml porre 1 ml della coltura di arricchimento da analizzare e 100 μl della sospensione di lavoro del CP, quindi centrifugare a 12000 x g per 5 minuti.

Lavare il pellet con 1.0 ml di acqua penta distillata e centrifugare nuovamente a 12000 x g per 5 min.

Risospendere il pellet in 300 μl di Chelex 100 e dopo omogeneizzazione in vortex, porre in bagnomaria acqua oppure in termo blocco riscaldato alla temperatura di $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, per 20 minuti, agitando in vortex ogni 5 minuti.

Trascorsi i 20 minuti di incubazione a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ vortexare ogni provetta per 10 secondi, quindi incubare in bagnomaria bollente, oppure in termo blocco riscaldato, alla temperatura di $99\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ per 8 minuti.

Porre immediatamente le provette trattate termicamente, in ghiaccio, per bloccare l'azione del calore, quindi vortexare per almeno 10 secondi al fine di facilitare la rottura delle cellule microbiche.

Centrifugare le provette a 12000 x g per 5 minuti.

Prelevare circa 200 μl del surnatante ed utilizzarne un'aliquota come template per la multiplex real-time PCR.

Il DNA così estratto e purificato può essere conservato per lungo tempo alla temperatura $< -18\text{ }^{\circ}\text{C}$. In condizioni di refrigerazione il DNA estratto resta stabile ed utilizzabile per la real-time PCR per tempi non superiori alle 24 ore.



CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

13.4 Multiplex real-time PCR

I primers e le sonde utilizzate per l'amplificazione dei geni che codificano per le tossine botuliniche e per il controllo di processo, sono stati disegnati, utilizzando il software Beacon Design versione 7.51 prodotto da Premier Biosoft, in modo da poter essere combinati in multiplex secondo i due schemi di 5-plex real-time PCR sotto indicati:

- schema 1: *bont/A* + *bont/B* + *bont/E* + *bont/F* + CP;
- schema 2: *bont/C* + *bont/D* + *bont/CD* + *bont/DC* + CP.

I differenti targets sopra riportati possono essere amplificati anche mediante schemi 3-plex e 2-plex, come specificato nella seguente tabella:

3-plex	Target botulismo umano	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/A</i> + <i>bont/B</i> + CP• <i>bont/E</i> + <i>bont/F</i> + CP
	Target botulismo animale	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/C</i> + <i>bont/D</i> + CP• <i>bont/CD</i> + <i>bont/DC</i> + CP
2-plex	Target botulismo umano	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/A</i> + CP• <i>bont/B</i> + CP• <i>bont/E</i> + CP• <i>bont/F</i> + CP
	Target botulismo animale	<ul style="list-style-type: none">• <i>bont/C</i> + CP• <i>bont/D</i> + CP• <i>bont/CD</i> + CP• <i>bont/DC</i> + CP

13.4.1 Preparazione della mix di reazione (Master mix Qiagen Quantitect multiplex Real-Time PCR)

Scongela la master mix, i primers e le sonde.

Combinare i componenti della mix di reazione come indicato nelle tabelle sottostanti, preparando la stessa in eccesso, in modo da compensare eventuali errori di pipettaggio.

Schema 1: 5-plex real time PCR (*bont/A* + *bont/B* + *bont/E* + *bont/F* + CP)

Volume totale di reazione: 25µl

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

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

QuantiTect Multiplex PCR noROX MasterMix Qiagen		
	<i>Conc. finale</i>	<i>µl/reazione</i>
Master mix	1x	12,50
Prim A*	600 nM	0,30
Prim 3B*	600 nM	0,30
Prim E*	600 nM	0,30
Prim F*	600 nM	0,30
Prim 4GyrB*	600 nM	0,30
Probe A (HEX)	100 nM	0,25
Probe 3B (FAM)	100 nM	0,25
Probe E (cy5)	100 nM	0,25
Probe F (Alexa350)**	300 nM	0,75
Probe 4GyrB (ROX)	50 nM	0,125
MgCl ₂ ***	9.5 mM	4,00
H ₂ O****		2,375
DNA – template		3,00

*= mix dei primers (senso e antisenso)

**= tale sonda può essere marcata anche con il fluoroforo cy 5.5. In questo caso la concentrazione finale è 200 nm invece di 300 nM

***= la master mix contiene già MgCl₂ al 5.5 Mm

****= la quantità di acqua va incrementata di 0.25 µl/reazione in caso si utilizzi la sonda Probe F marcata con il fluoroforo cy 5.5.

Schema 2: 5-plex real time PCR (*bont/C + bont/D + bont/CD + bont/DC + CP*)

Volume totale di reazione: 25µl

QuantiTect Multiplex PCR noROX MasterMix Qiagen		
	<i>Conc. finale</i>	<i>µl/reazione</i>
Master mix	1x	12,50
Prim ANI_C*	200 nM	0,10
Prim ANI_D*	300 nM	0,20
Prim ANI_CD*	600 nM	0,30
Prim ANI_DC*	600 nM	0,30
Prim ANI_CP*	600 nM	0,30
Probe ANI_C (HEX)	100 nM	0,25
Probe ANI_D (FAM)	100 nM	0,25
Probe ANI_CD (cy5)	100 nM	0,25
Probe ANI_DC (Alexa350)**	300 nM	0,75



CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

<u>Probe ANI CP (ROX)</u>	<u>50 nM</u>	<u>0,125</u>
<u>MgCl₂***</u>	<u>9.5 mM</u>	<u>4,00</u>
<u>H₂O****</u>		<u>2,675</u>
<u>DNA – template</u>		<u>3,00</u>

*= mix dei primers (senso e antisenso)

**= tale sonda può essere marcata anche con il fluoro foro cy5.5. in questo caso la concentrazione finale è 200 nm invece di 300 nM

***= la master mix contiene già MgCl₂ al 5.5 mM

****= la quantità di acqua va incrementata di 0.25 µl/reazione in caso si utilizzi la sonda Probe F marcata con il fluoroforo cy 5.5.

Nel caso in cui si utilizzino gli schemi 3-plex o 2-plex, la concentrazione finale dei primers e delle sonde rimane quella indicata nelle tabelle di cui sopra. Il volume dell'acqua deve essere aggiustato fino ad arrivare 25 µl.

Profilo termico della reazione valido sia per Stratagene Mx3005P che per Bio-Rad CFX96

95°C per 15 minuti	1 ciclo
94°C per 30 secondi	40 cicli
56°C per 90 secondi	

Filter gain setting per Stratagene Mx3005P

HEX = 1x	FAM = 1x	Cy5 = 1x
ROX = 1x	Alexa350 = 8 x	

La determinazione del fluoroforo cy5.5 può essere effettuata efficacemente con il termociclatore Bio-Rad CFX96 equipaggiato con i filtri per la discriminazione dei fluorofori FAM, HEX, ROX, cy5, Quasar 705 in quanto cy5 e Quasar 705 hanno lunghezze d'onda molto vicine sia in assorbimento che in emissione di fluorescenza.

13.5 - Isolamento delle colonie pure di clostridi produttori di tossine botuliniche - Parte opzionale

Nota: L'isolamento di colonie pure di clostridi produttori di tossine botuliniche, non è rilevante ai fini dell'emissione del risultato.

Il risultato fa riferimento alla presenza o assenza di clostridi produttori di tossine botuliniche, ma non definisce la specie batterica produttrice delle tossine stesse.

Il seguente paragrafo viene applicato esclusivamente ai fini della caratterizzazione dei ceppi di riferimento prodotti dal CNRB.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

Contemporaneamente alla multiplex real-time PCR per la valutazione della presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nelle colture di arricchimento, è possibile effettuare dalle colture stesse, degli strisci di isolamento su piastre di EYA o MCTM* (quest'ultimo è indicato per i ceppi di *C. botulinum* tipo C e D). Per facilitare l'isolamento dei clostridi produttori di tossine botuliniche, prima dello striscio si piastra può essere utile sottoporre 0.5-1 ml della coltura di arricchimento a trattamento termico in bagnomaria alla temperatura di $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti. Qualora si ipotizzasse la presenza di *C. botulinum* tipo E, oppure di *C. butyricum* tipo E (che hanno una resistenza termica minore) è consigliabile effettuare sulla coltura di arricchimento il trattamento con l'alcol invece del trattamento termico. A questo proposito prelevare 0.5-1.0 ml della coltura di arricchimento e aggiungere un uguale volume di alcol assoluto (sterilizzato per filtrazione usando filtri tipo Millipore a siringa con pori del diametro di $0.45\mu\text{m}$) ed incubare a temperatura ambiente per un'ora, agitando la sospensione ogni 15 minuti. Incubare le piastre in condizioni di anaerobiosi per $48\text{ h} \pm 2\text{h}$ alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

* In caso di isolamento dei ceppi di *C. botulinum* tipo C e D pre-ridurre, prima dell'uso, il terreno MCTM lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno due giorni.

13.5.1 Selezione e purificazione delle colonie tipiche

Su piastre di EYA o di MCTM le colonie tipiche di *C. botulinum* appaiono generalmente rugose con contorno irregolare e mostrano superficie iridescente quando osservate a luce obliqua. Questo effetto è dovuto all'azione della lipasi, che conferisce alla colonia un aspetto perlaceo che si estende anche oltre la colonia, seguendone i contorni. Le colonie di *C. botulinum* tipo C, D ed E possono essere circondate da una zona (2-4 mm) di precipitato biancastro dovuto all'azione della lecitinasi. Le colonie tipiche di *C. butyricum* e *C. baratii* produttori di tossine botuliniche sono lipasi negative e appaiono di colore chiaro, leggermente trasparenti con margini irregolari e quasi piatte.

Selezionare almeno 5 colonie tipiche e servendosi di un'ansa sterile strisciare ogni colonia su due piastre di EYA o MCTM. Incubare una piastra in condizioni di anaerobiosi e una piastra in condizioni di aerobiosi per $48\text{ h} \pm 2\text{h}$, alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se le colonie cresceranno soltanto sulla piastra incubata in anaerobiosi, la coltura può essere considerata pura.

13.5.2 Conferma della presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nelle colonie tipiche

Sulle colonie tipiche è necessario confermare la presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche. A tal fine selezionare almeno 5 colonie pure e con l'utilizzo di un'ansa



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR**

REV. 0

sterile trapiantarle in provette di TPGY (in caso di ceppi di *C. botulinum* tipo C o D trapiantare le colonie pure in provette di CMF).

Incubare le provette di TPGY o CMF seminate, in condizioni di anaerobiosi per 24h \pm 2h alla temperatura di 30°C \pm 1°C.

Trascorso il periodo di incubazione, prelevare 1 ml della brodocoltura e trasferirlo in provetta tipo Eppendorf da 2 ml. Effettuare l'estrazione degli acidi nucleici come indicato al punto 10.3 la reazione di real-time PCR come indicato al punto 10.4.

13.6 Identificazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche

L'identificazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche non fa parte dello scopo della presente Procedura Operativa.

14. CONVALIDA DEI RISULTATI

Ai fini della ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR sono considerati positivi i test in cui viene evidenziata la presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nelle colture di arricchimento.

Un test è considerato positivo se si osserva l'incremento della fluorescenza di uno o più fluorofori con cui sono marcate le sonde relative ai geni che codificano per la produzione di tossine botuliniche, e del fluoroforo relativo al CP. Tale incremento di fluorescenza deve produrre un Ct con valore minore di 35.

Un test è considerato negativo se si osserva l'incremento della fluorescenza del solo fluoroforo relativo al CP. Tale incremento di fluorescenza deve produrre un Ct con valore minore di 35.

Se non si osserva alcun incremento di fluorescenza del fluoroforo relativo al CP, significa che nel pozzetto non è avvenuta la reazione di PCR, a causa di una non corretta estrazione oppure perché nel campione sono presenti inibenti della PCR. In questo caso non è possibile esprimere un risultato di negatività ed è necessario ripetere il test operando una diluizione 1:10 o 1:100 del *template* in acqua penta distillata sterile oppure in acqua per PCR sterile. Se l'inibizione della reazione dovesse persistere sarà necessario estrarre nuovamente gli acidi nucleici dalla coltura di arricchimento.

Valori di Ct maggiori di 35 non possono essere considerati indicatori di positività del test in quanto in una reazione di multiplex real-time PCR, dopo un elevato numero di cicli di amplificazione, è possibile assistere ad amplificazioni aspecifiche oppure a degradazione delle sonde con conseguente incremento di fluorescenza.

15. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche viene effettuata con metodo qualitativo ed è espressa come determinazione della presenza o assenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche, nel campione analizzato.

- Qualora sia stata rilevata la presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nel campione esaminato, il risultato si esprime come: *positivo*.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 0
-------------------	--	---------------

- Qualora non sia stata rilevata la presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nel campione esaminato, il risultato si esprime come: *negativo*.”

16. CONTROLLI DI QUALITÀ

Il controllo di qualità interno del metodo viene eseguito con cadenza annuale applicando le prescrizioni della procedura **POQMSP01** “Controllo di qualità interno”.

Il controllo di qualità dei terreni e dei materiali viene effettuato applicando le prescrizioni della **POQTBM1** “Preparazione, sterilizzazione e controllo di qualità dei terreni e dei materiali destinati alla microbiologia”.

17. RIESAME DELLA VALIDAZIONE

Annualmente il laboratorio procede ad un riesame della validazione del metodo. Ove possibile nel riesame sono tenuti in considerazione i risultati di sensibilità e specificità relativi agli ultimi 5 anni. Il riesame può essere effettuato rianalizzando i risultati ottenuti dalle prove effettuate su campioni a titolo ignoto del microrganismo da ricercare, oppure quelli derivati dalla partecipazione a prove valutative. I parametri di prestazione del metodo presi in considerazione sono: sensibilità, specificità, ripetibilità ed accuratezza. In caso di scostamento dei valori relativi ai parametri di prestazione del metodo ottenuti in sede di riesame rispetto ai requisiti specificati nel piano di validazione, la validazione deve essere ripetuta.

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

18. ARCHIVIAZIONE E CONSERVAZIONE

La copia originale in formato cartaceo della presente procedura è conservata presso l'Archivio del SGQ del Dipartimento gestito dal RAQ-SP.

19. DESTINATARI

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



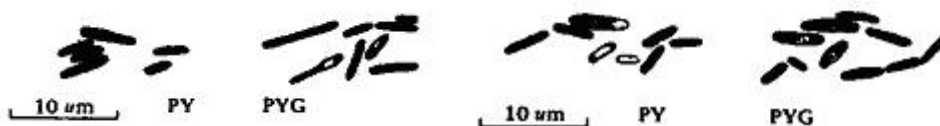
CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

Appendice 1

MORFOLOGIA DEI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE OSSERVATI AL MICROSCOPIO OTTICO.



Clostridium botulinum, type A.

Clostridium butyricum.



Clostridium baratii.



CNRB31.010

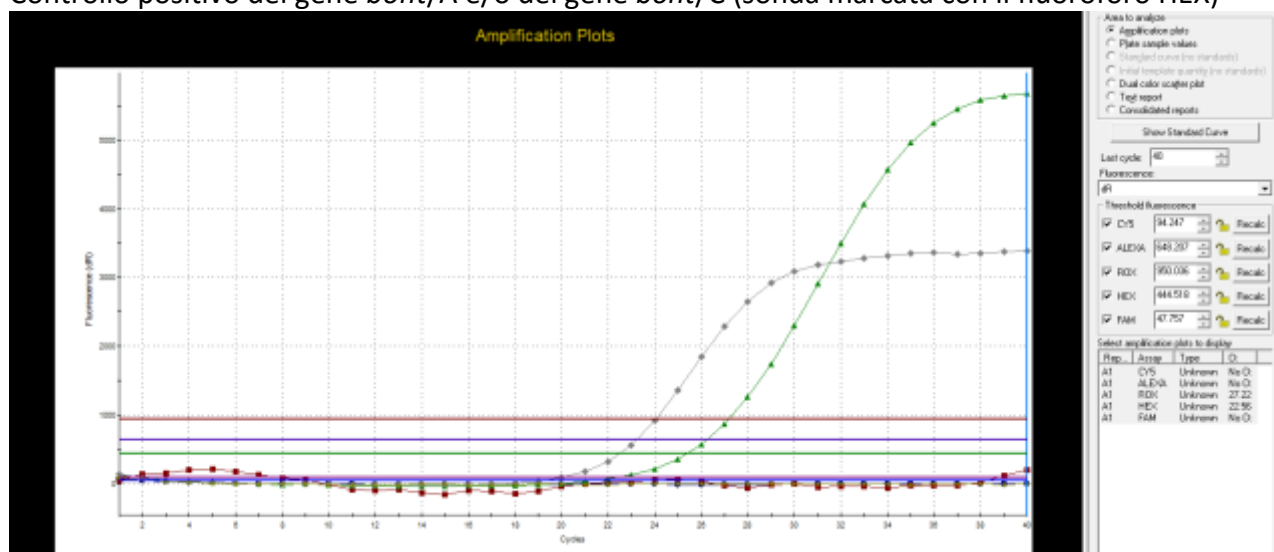
METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR

REV. 0

Appendice 2

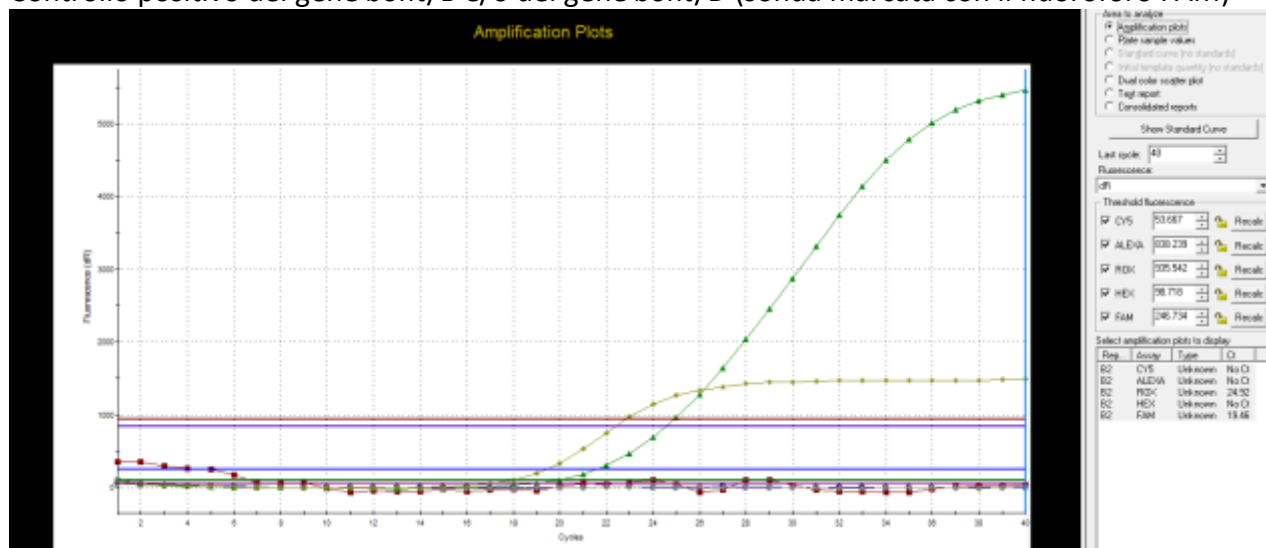
Curve di amplificazione dei controlli positivi di PCR

Controllo positivo del gene *bont/A* e/o del gene *bont/C* (sonda marcata con il fluoroforo HEX)



Curva grigia (◆) *bont/A* e/o *bont/C* -HEX Curva verde (■) CP -ROX

Controllo positivo del gene *bont/B* e/o del gene *bont/D* (sonda marcata con il fluoroforo FAM)



Curva gialla (◆) *bont/A* e/o *bont/D* -FAM Curva verde (■) CP -ROX

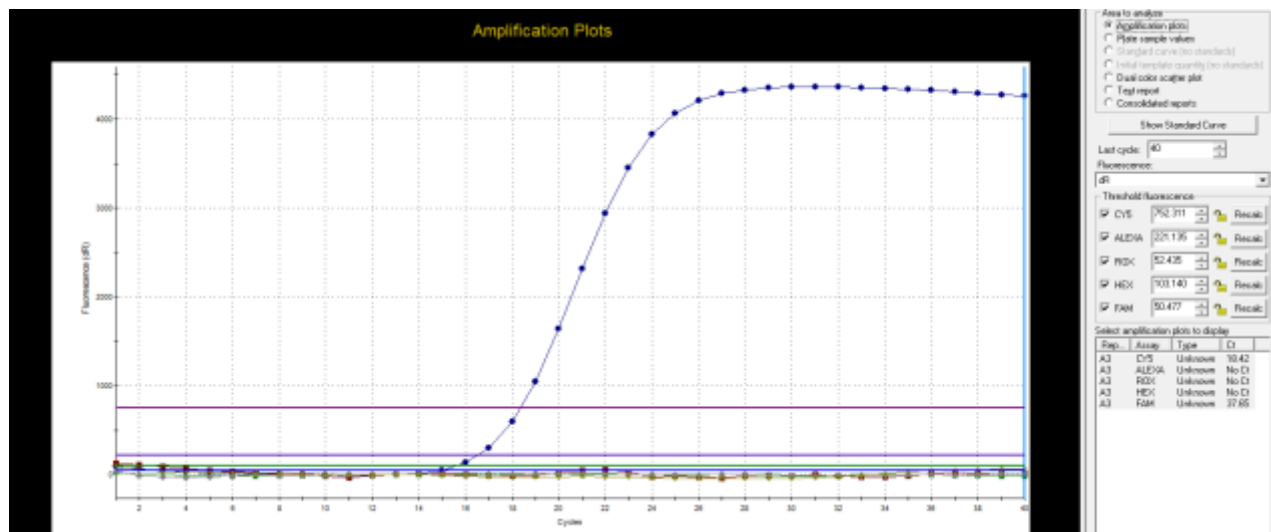
Controllo positivo del gene *bont/E* e/o del gene *bont/CD* (sonda marcata con il fluoroforo Cy5)



CNRB31.010

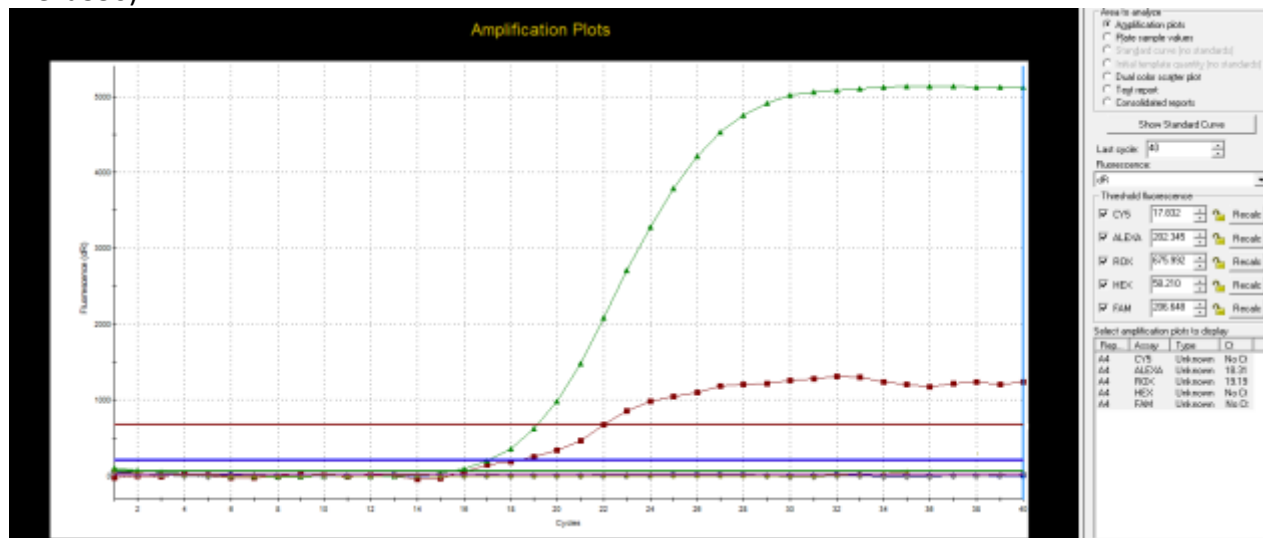
METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0



Curva blu (→) bont/E e/o bont/CD -Cy5

Controllo positivo del gene *bont/F* e/o del gene *bont/DC* (sonda marcata con il fluoroforo Alexa350)



Curva rossa (→) *bont/F* e/o *bont/DC* -Alexa350 Curva verde (→) CP -ROX



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

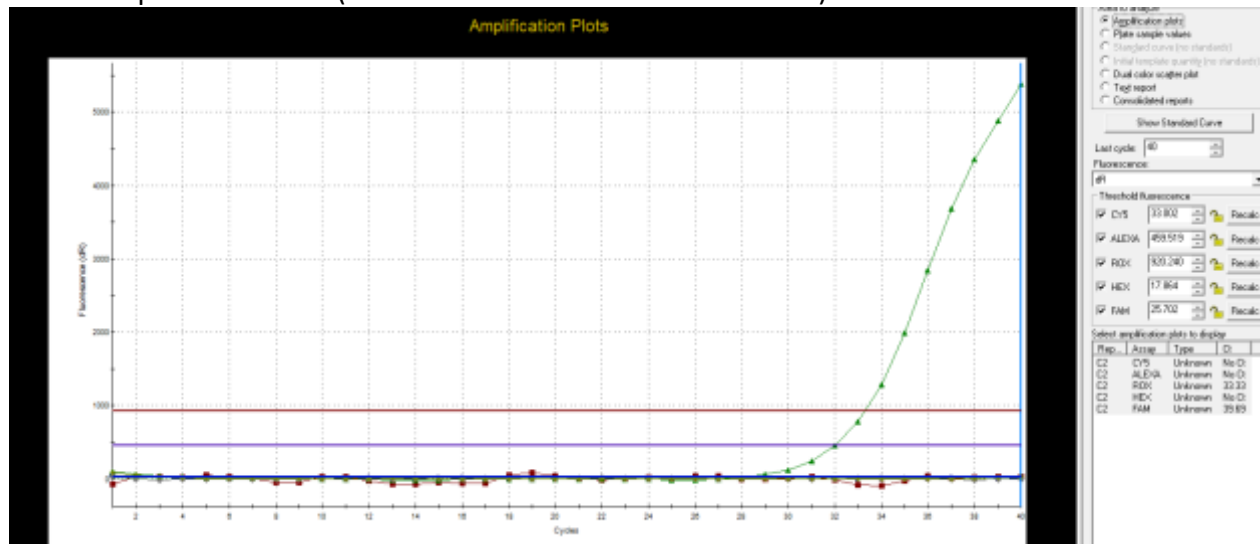
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

Controllo positivo del CP (sonda marcata con il fluoroforo ROX)



Curva verde (■) CP -ROX



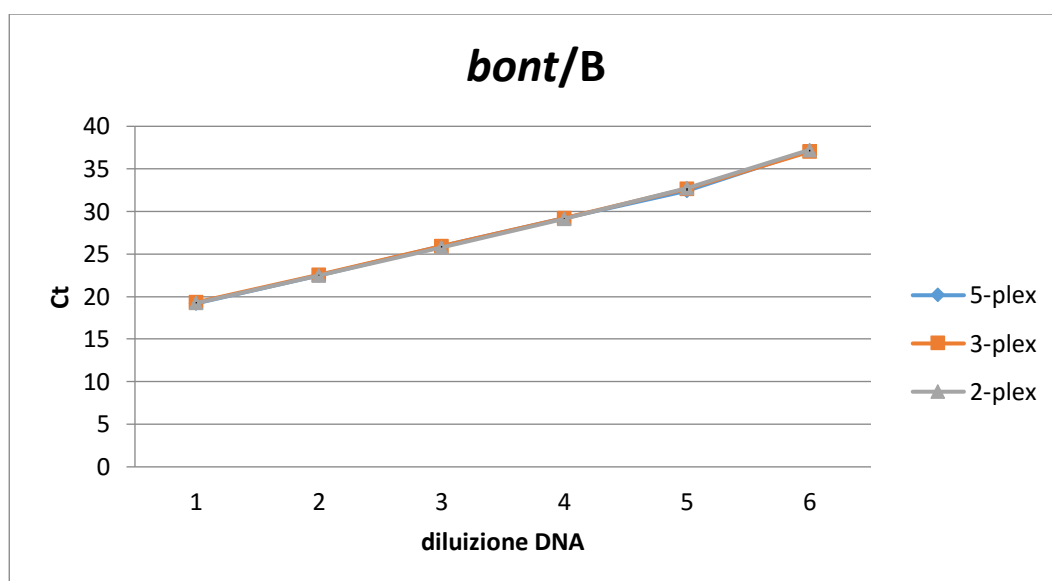
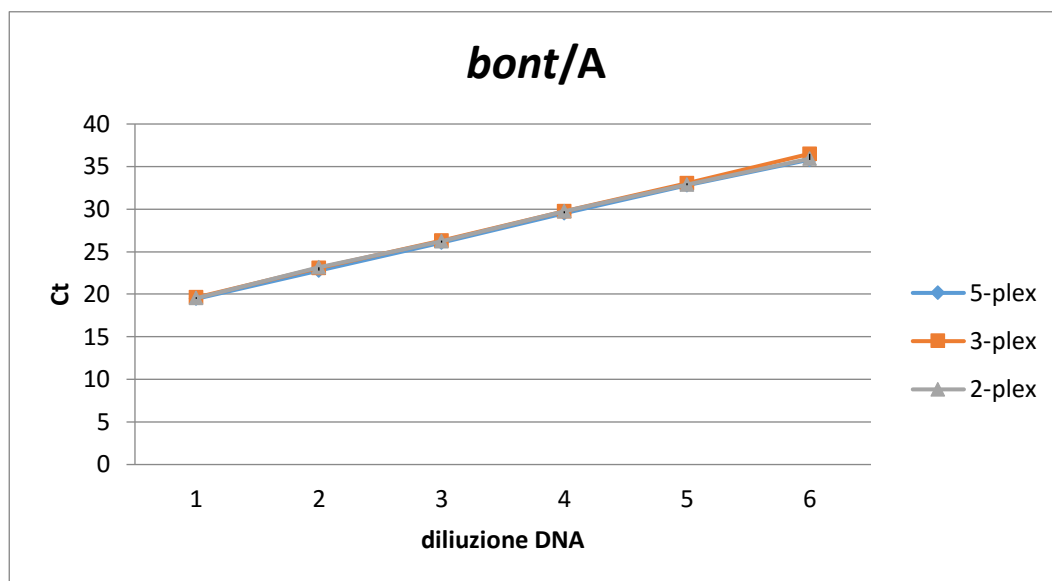
CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

Appendice 3

Curve di comparazione degli schemi 5-plex, 3-plex, 2-plex

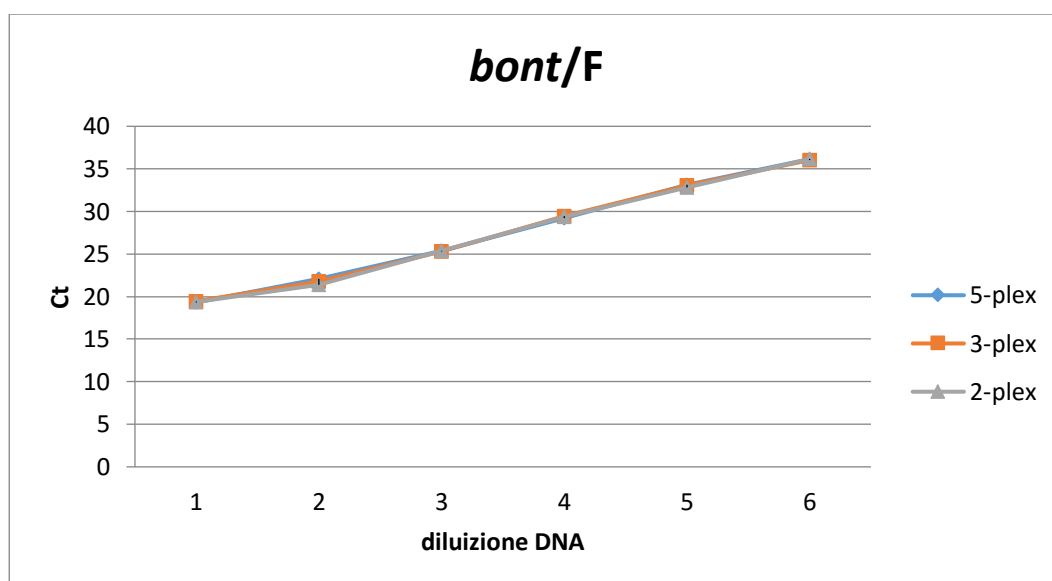
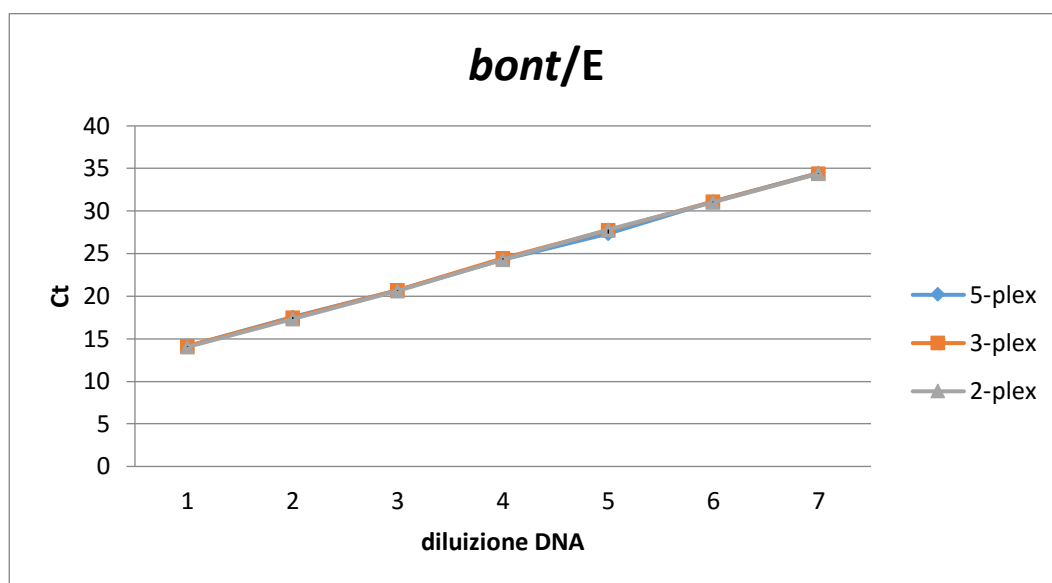




CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

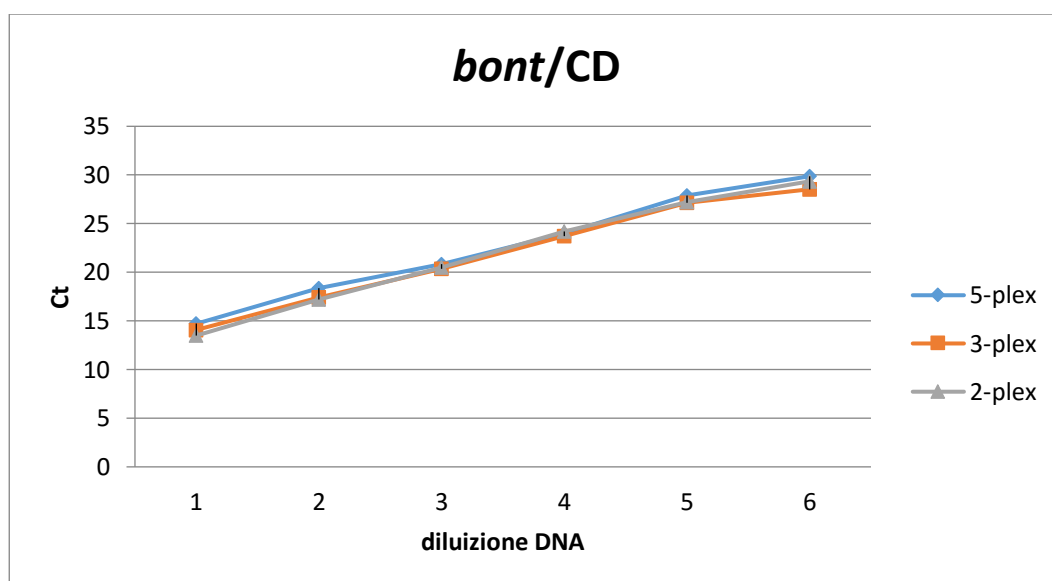
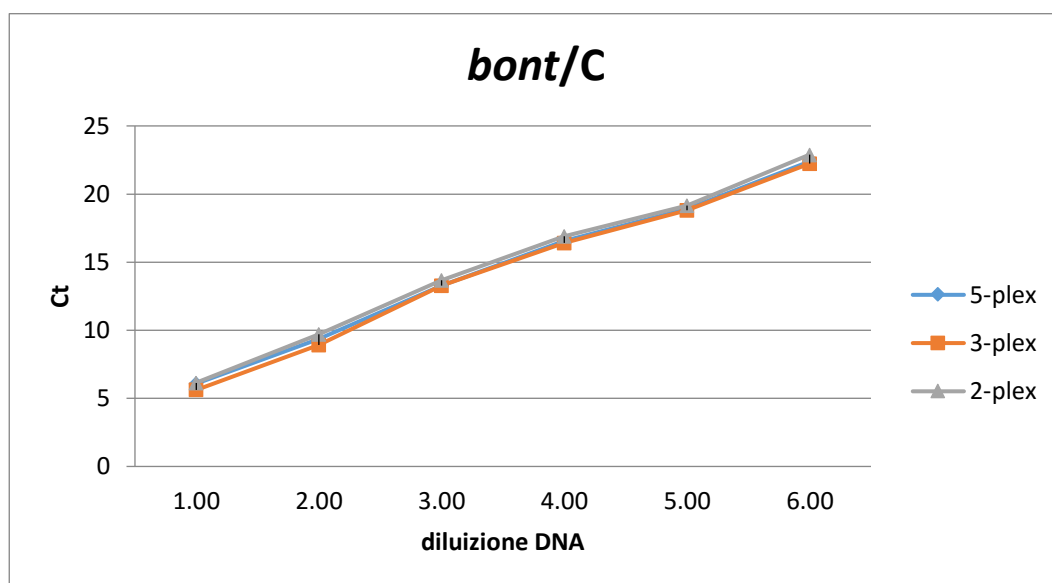




CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0





CNRB31.010

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI
DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX
REAL-TIME PCR

REV. 0

