

## **Risultati del 3° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) da tamponi di carcasse- 2009**

Il terzo test nazionale inter-laboratorio sulla ricerca e l'identificazione dei ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è stato organizzato nel 2009 dal Laboratorio Nazionale di Riferenza (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità ed è stato dedicato alla ricerca dei microrganismi in tamponi di carcasse bovine. Poiché il Laboratorio è anche Laboratorio Comunitario di Riferenza (CRL) per questo patogeno, il ring test nazionale è stato condotto contestualmente al ring test europeo. Quest'ultimo ha visto la partecipazione di 29 LNR di 25 Stati Membri dell'Unione Europea incluso il CRL, e la Svizzera, attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare,.

### **1- PARTECIPANTI**

Al ring test nazionale hanno partecipato 11 laboratori di 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sede di Torino
- IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, sede di Brescia
- IZS delle Venezie, sede di Cordenons (Pn)
- IZS dell'Umbria e delle Marche, sede di Perugia
- IZS del Lazio e Toscana, sede di Roma (2 laboratori)
- IZS dell'Abruzzo e del Molise, sede di Teramo
- IZS del Mezzogiorno, sede centrale di Portici
- IZS del Mezzogiorno, sede di Fuorni-Salerno
- IZS della Puglia e Basilicata, sede di Foggia
- IZS della Sicilia, sede di Palermo

## 2- OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

Considerati i risultati soddisfacenti del primo e del secondo test, che hanno avuto lo scopo di valutare e sviluppare la capacità dei laboratori di identificare correttamente un ceppo di *E.coli* come un VTEC, in particolare per i sierogruppi considerati più pericolosi per l'uomo, il test del 2009 è stato dedicato alla ricerca dei VTEC in campioni di origine animale, con l'obiettivo di preparare i laboratori a condurre le indagini relative al monitoraggio dei VTEC nelle popolazioni animali che l'EFSA sta programmando, probabilmente per il 2010.

A questo proposito, l'EFSA ha elaborato una bozza di "*Guidance on the technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food*" (EFSA Journal 2009; 7(11):1366), che prevede una stima della prevalenza della contaminazione da VTEC O157 sulle carcasse di bovini e ovini al macello. Il documento dell'EFSA prevede l'utilizzo di un protocollo analitico derivato dal metodo ISO 16654:2001, per la ricerca di *E. coli* O157 negli alimenti e, come obiettivo secondario, la ricerca negli stessi campioni dei sierogruppi VTEC maggiormente coinvolti nelle infezioni umane: O26, O103, O111 e O145. Per tali sierogruppi viene indicato quale metodo di identificazione, il protocollo di Real-Time PCR per la ricerca dei VTEC negli alimenti, sviluppato nell'ambito del Gruppo di Lavoro CEN/TC 275/WG6 e attualmente in fase di approvazione presso l'ISO.

Poiché il piano di monitoraggio EFSA nei bovini sarà basato sulla ricerca dei VTEC in tamponi superficiali di carcasse, prelevati al macello mediante spugnette umide, lo studio del 2009 ha riguardato l'esame di spugnette che potevano contenere sia VTEC O157 che non-O157, insieme ad altra flora batterica.

Ai laboratori è stato richiesto di ricercare i VTEC O157 usando il metodo ISO 16654:2001 per *E. coli* O157 negli alimenti, modificato nella fase di arricchimento, e i VTEC non-O157 (facoltativa) con il metodo di Real-Time PCR utilizzando *primer* e *probe* descritti in una linea-guida proposta dal CRL-VTEC (**Allegato 1**).

Per la valutazione delle *performance* dei laboratori partecipanti lo studio è stato suddiviso in 4 fasi:

1. **obbligatoria**: isolamento di VTEC O157 attraverso la procedura ISO 16654:2001 modificata e identificazione, mediante amplificazione PCR, dei loro principali geni di virulenza, utilizzando i metodi PCR (convenzionale o RealTime) proposti dal CRL-VTEC;
2. **facoltativa**: ricerca della presenza di VTEC O157 e non-O157 appartenenti ai sierogruppi maggiormente coinvolti nelle infezioni umane (O26, O103, O111 e O145)

utilizzando il metodo di Real-time PCR già proposto nello studio 2008 e riportato nella procedura di laboratorio allegata (**Allegato 1**).

3. isolamento dei ceppi VTEC non-O157 dai campioni risultati positivi alla Real-time PCR.
4. caratterizzazione dei ceppi VTEC non-O157 isolati determinando il sierogruppo e i geni di virulenza: *vtx1*, *vtx2*, *eae* (intimina).

### 3- MATERIALI E METODI

Il set di campioni oggetto di analisi era costituito da 5 spugne (A-E) contenenti diverse concentrazioni dei ceppi VTEC da ricercare e una flora di *background*.

Le caratteristiche dei campioni sono riportate in tabella 1:

**Tabella 1: Caratteristiche dei campioni (spugne per tamponi) inclusi nello studio**

Contaminanti	Campione A	Campione B	Campione C	Campione D	Campione E
VTEC O157 <i>vtx1</i> , <i>vtx2</i> , <i>eae</i>	2 UFC/ml	$2 \times 10^3$ UFC/ml	20 UFC/ml	Assente	Assente
VTEC O26 <i>vtx1</i> , <i>eae</i>	none	40 UFC/ml	$4 \times 10^3$ UFC/ml	40 UFC/ml	Assente
<i>E. coli</i>	$10^2$ UFC/ml	$10^2$ UFC/ml	$10^2$ UFC/ml	$10^2$ UFC/ml	$10^2$ UFC/ml
<i>K. pneumoniae</i>	$2 \times 10^2$ UFC/ml	$2 \times 10^2$ UFC/ml	$2 \times 10^2$ UFC/ml	$2 \times 10^2$ UFC/ml	$2 \times 10^2$ UFC/ml
<i>S. faecalis</i>	$5 \times 10^2$ UFC/ml	$5 \times 10^2$ UFC/ml	$5 \times 10^2$ UFC/ml	$5 \times 10^2$ UFC/ml	$5 \times 10^2$ UFC/ml

Per ciascun campione era richiesto di esprimere il risultato analitico soltanto in termini qualitativi ovvero di determinare la **presenza/assenza** dell'analita nella matrice.. Relativamente a ciascuna fase analitica le performance di ciascun partecipante allo studio sono state valutate in termini di:

- Concordanza (Kappa di Cohen)
- Sensibilità
- Specificità

Per il calcolo di tali parametri sono stati confrontati i risultati delle determinazioni analitiche ottenute dai laboratori con i valori reali (*gold standard*) dei campioni oggetto di analisi.

La valutazione del livello di concordanza è stata ottenuta attraverso il calcolo del Kappa di Cohen che permette di stimare l'accordo tra il risultato analitico e il valore gold standard, indipendentemente dalla componente imputabile al caso. Per la valutazione dell'accettabilità del valore Kappa è stata utilizzata la griglia di giudizio proposta da *Fleiss J.L. (Statistical methods for rates and proportions, 1981)* secondo la quale valori di  $K \geq 0,75$  indicano livelli di concordanza eccellenti, valori  $0,40 \leq K < 0,75$  buona concordanza e valori  $K < 0,40$  livelli di concordanza scarsi.

La valutazione della sensibilità diagnostica è stata ottenuta in termini di rapporto tra il numero delle determinazioni analitiche positive, ovvero con presenza dell'analita oggetto del metodo (sia esso il ceppo *E.coli* o i geni di virulenza / siero gruppo-specifici), sul totale delle determinazioni analitiche possibili, realmente positive. La valutazione della specificità diagnostica è stata ottenuta in termini di rapporto tra il numero delle determinazioni negative, ovvero con assenza dell'analita, sul totale delle determinazioni analitiche possibili, realmente negative. Per tutti i parametri è stato calcolato il relativo intervallo di confidenza (95% I.C.).

## 4 - RISULTATI

### 4.1 Fase 1 - Ricerca di *E.coli* O157 (metodo ISO16654:2001 modificato) (obbligatoria)

Tutti i laboratori hanno eseguito questa parte del test, e tutti hanno identificato correttamente la presenza di *E.coli* O157 (Tabella 2).

**Tabella 2. Ricerca di *E.coli* O157 (metodo ISO16654:2001 modificato)**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio										
			L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41
Isolamento di <i>E.coli</i> O157	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tutti i laboratori hanno anche eseguito i saggi di PCR per la caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati (identificazione dei geni *vtx1*, *vtx2*, *eae*).

I risultati delle determinazioni eseguite e il valore di gold standard per ciascuna caratteristica sono riportate nella tabella 3.

**Tabella 3. Determinazione dei geni di virulenza nei ceppi di *E.coli* O157 isolati dai campioni**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio										
			L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41
vtx1	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
vtx2	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
eae	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Dieci Laboratori hanno identificato correttamente la presenza dei geni di virulenza in tutti e tre i ceppi isolati. Un solo laboratorio ha commesso un errore nell'identificazione del gene *vtx1* nel ceppo isolato dal campione C.

#### **4.2 Fase 2 - Ricerca della presenza di ceppi VTEC mediante metodo Real-time PCR (facoltativa)**

Solo 4 laboratori hanno eseguito questa parte del test. La tabella 4 riporta i risultati relativi alla ricerca della presenza dei geni di virulenza *vtx1*, *vtx2* ed *eae* nella coltura di arricchimento.

**Tabella 4. Presenza di geni di virulenza nella coltura di arricchimento (metodo Real-time PCR)**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio			
			L34	L35	L38	L41
<i>vtx1</i>	A	+	+	+	+	-
	B	+	+	+	+	-
	C	+	+	+	+	-
	D	+	+	+	+	+
	E	-	-	+	-	-
<i>vtx2</i>	A	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+
	C	+	-	+	+	+
	D	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-
<i>eae</i>	A	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+
	D	+	+	+	+	+
	E	-	-	+	-	-

Un laboratorio ha identificato correttamente la presenza/assenza dei tre geni di virulenza nelle colture di arricchimento di tutti i 5 campioni. Gli altri laboratori hanno commesso rispettivamente 1, 2 e 3 errori.

La tabella 5 riporta i risultati relativi alla ricerca della presenza dei geni sierogruppo-specifici nella coltura di arricchimento.

**Tabella 5. ricerca della presenza dei geni siero gruppo-specifici nella coltura di arricchimento (metodo Real-time PCR)**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio			
			L34	L35	L38	L41
O157	A	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	
	C	+	+	+	+	
	D	-	-	-	-	
	E	-	-	-	-	
O26	A	-	-	-	-	
	B	+	+	+	+	
	C	+	+	+	+	
	D	+	+	+	+	
	E	-	+	-	-	
O111	A	-	-	-	-	
	B	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	
	D	-	-	-	-	
	E	-	-	-	-	
O103	A	-	-	-	-	
	B	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	
	D	-	-	-	-	
	E	-	-	-	-	
O145	A	-	-	-	-	
	B	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	
	D	-	-	-	-	
	E	-	-	-	-	

Tre laboratori hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei 5 geni sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento di tutti i 5 campioni. Il quarto laboratorio ha commesso un errore.

#### 4.3 Fase 3 - Isolamento di VTEC O26 dalle colture di arricchimento RT-PCR positive

Tre dei 4 laboratori che hanno eseguito la ricerca dei geni nelle colture di arricchimento hanno tentato l'isolamento del ceppo di VTEC O26 responsabile delle positività. Due laboratori hanno isolato correttamente VTEC O26 dai tre campioni positivi. Il terzo laboratorio ha mancato di isolare il ceppo da due dei tre campioni.

I risultati sono riportati nella tabella 6.

**Tabella 6. Isolamento di VTEC O26 dalle colture di arricchimento RT-PCR positive**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio			
			L34	L35	L38	L41
Isolamento di VTEC O26	A	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	-	-
	C	+	+	+	+	+
	D	+	+	+	-	-
	E	-	-	-	-	-

Due laboratori che non avevano effettuato lo screening preventivo mediante Real Time PCR hanno comunque tentato l'isolamento dei ceppi di VTEC non-O157 dalle colture di arricchimento. I risultati sono riportati nella tabella 7.

**Tabella 7. Isolamento di VTEC non-O157 dalle colture di arricchimento**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio	
			L37	L40
Isolamento di VTEC non-O157	A	-	-	-
	B	VTEC O26	-	VTEC O26
	C	VTEC O26	VTEC O26	VTEC O26
	D	VTEC O26	VTEC O26	VTEC O26
	E	-	-	-

Un laboratorio ha isolato correttamente VTEC O26 dai tre campioni positivi. L'altro laboratorio ha mancato di isolare il ceppo da uno dei tre campioni.



#### 4.4 Fase 4 - Determinazione dei geni di virulenza dei ceppi di *E.coli* O26 isolati

Dei laboratori che hanno isolato *E.coli* O26, quattro hanno anche eseguito i saggi di PCR per la caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati (identificazione dei geni *vtx1*, *vtx2*, *eae*). I risultati delle determinazioni eseguite sono riportate nella tabella 8.

**Tabella 8. Determinazione dei geni di virulenza nei ceppi di *E.coli* O26 isolati dai campioni**

Test	Campione	Gold Standard	Laboratorio			
			L34	L37	L38	L40
<i>vtx1</i>	B	+	+		+	+
	C	+	+	+	+	
	D	+	+	+	+	
<i>vtx2</i>	B	-	-		-	-
	C	-	-	-	-	
	D	-	-	-	-	
<i>eae</i>	B	+	+		+	+
	C	+	+	+	+	
	D	+	+	+	+	

#### 4.5 Performance analitiche

Le performance dei laboratori che hanno partecipato alle varie fasi dello studio sono state valutate in termini di concordanza, sensibilità e specificità. I valori di concordanza valutati tramite il Kappa di Cohen sono rappresentati nella tabella 9.

Tutti i laboratori hanno riportato livelli di concordanza eccellenti per le fasi analitiche obbligatorie dello studio. Anche nella parte facoltativa, che ha coinvolto un minor numero di laboratori, il livello di concordanza è stato molto elevato, in particolare per la fase 2 (screening mediante Real Time PCR) ove la maggior parte dei valori di Kappa ricadevano nell'area di concordanza eccellente.

**Tabella 9. Concordezza (Kappa di Cohen) dei risultati ottenuti nelle diverse fasi analitiche con i valori di gold standard. Sono indicati in verde valori di  $K > 0.75$  (concordezza eccellente), in giallo i valori  $0.45 < K < 0.75$  (concordezza buona), in rosso i valori  $K < 0.45$  (concordezza scarsa)**

	Obbligatoria		Facoltativa			
Fase analitica	1		2		3	4
Laboratori	Isolamento di E.coli O157 (ISO)	Identificazione geni di virulenza dei ceppi O157	Identificazione vtx1, vtx2, eae (Real-Time PCR)	Identificazione geni sierogruppo specifici (Real-Time PCR)	Isolamento di ceppi VTEC O26	Identificazione dei geni di virulenza dei ceppi VTEC O26
L31	1,00	1,00				
L32	1,00	1,00				
L33	1,00	1,00				
L34	1,00	1,00	0,84	1,00	1,00	1,00
L35	1,00	1,00	0,59	0,90		
L36	1,00	1,00				
L37	1,00	1,00			0,67	nd
L38	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L39	1,00	1,00				
L40	1,00	1,00			1,00	1,00
L41	1,00	0,87	0,59	1,00	0,44	

Complessivamente, tutti i laboratori che hanno partecipato allo studio hanno riportato valori di concordezza eccellenti o buoni per le prove analitiche sostenute.

I valori di sensibilità e specificità ottenuti dai laboratori per ciascuna fase analitica sono riassunti nelle tabelle 10 e 11.

**Tabella 10. Valori di sensibilità nelle diverse fasi analitiche, per ciascun laboratorio partecipante**

<i>Fase analitica</i>	<b>Obbligatoria</b>		<b>Facoltativa</b>			
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>	<b>4</b>
	<i>Isolamento di E.coli O157 (ISO)</i>	<i>Identificazione geni di virulenza dei ceppi O157</i>	<i>Identificazione vtx1, vtx2, eae (Real-Time PCR)</i>		<i>Isolamento di ceppi VTEC O26</i>	<i>Identificazione dei geni di virulenza dei ceppi VTEC O26</i>
<i>Laboratori</i>						
<i>L31</i>	100%	100%				
<i>L32</i>	100%	100%				
<i>L33</i>	100%	100%				
<i>L34</i>	100%	100%	91%	100%	100%	100%
<i>L35</i>	100%	100%	100%	100%		
<i>L36</i>	100%	100%				
<i>L37</i>	100%	100%			67%	100%
<i>L38</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>L39</i>	100%	100%				
<i>L40</i>	100%	100%			100%	100%
<i>L41</i>	100%	89%	73%	100%	33%	

Tabella 11. Valori di Specificità nelle diverse fasi analitiche, per ciascun laboratorio partecipante

Fase analitica	Obbligatoria		Facoltativa			
	1		2		3	4
	Isolamento di <i>E.coli</i> O157 (ISO)	Identificazione geni di virulenza dei ceppi O157	Identificazione vtx1, vtx2, eae (Real-Time PCR)		Isolamento di ceppi VTEC O26	Identificazione dei geni di virulenza dei ceppi VTEC O26
Laboratori						
L31	100%	nd				
L32	100%	nd				
L33	100%	nd				
L34	100%	nd	100%	100%	100%	100%
L35	100%	nd	50%	95%		
L36	100%	nd				
L37	100%	nd			100%	nc
L38	100%	nd	100%	100%	100%	100%
L39	100%	nd				
L40	100%	nd			nc	100%
L41	100%	nd	100%	100%	100%	



## **Third inter-laboratory study on Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): detection and identification in animal samples**

### **Outline of the methods**

#### **Detection of VTEC O157**

The ISO 16654:2001 standard method for the detection of *E. coli* O157 in food and feed, shall be used for cattle hide swabs, with the following modification, concerning the enrichment step:

- The sponge shall be added with 90 mL of pre-warmed BPW and incubated at 41.5 ±1°C for 18 hours.

The immunomagnetic separation and isolation steps will be performed at the end of the enrichment stage according to the protocol described in ISO 16654:2001, as well as the identification of suspected colonies. The *E. coli* O157 strains isolated must be confirmed as VTEC by testing for the presence of *eae* and *vtx* genes. The PCR method for detecting *eae* and *vtx* genes is provided in **Annex 1**. The procedure is summarized in Figure 1.

#### **Detection of non-O157 VTEC**

The recommended detection method is a Real-time PCR protocol submitted to ISO in the form of "Technical Specification" by Working Group 6 of the Technical Committee 275 of the European Normalisation Committee (CEN TC275/WG6). The method targets both virulence genes (*vtx1* and *vtx2*, and *eae*) and serogroup-specific genes for O26, O103, O111 and O145. It shall be used for screening samples, but requires a confirmation step with the isolation of the VTEC strains responsible for the positive PCR reactions.

The method is applied to the same enrichment culture performed for the isolation of VTEC O157. One ml aliquot of such a culture is used for DNA extraction and purification. This step shall be accomplished according to the ISO 20837:2006 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection”. The remaining culture shall be stored at 4°C for the isolation steps that will follow a positive PCR result.

Real-time PCR is performed using the primers and probes described in the guideline included as **Annex 2**. Amplification conditions to be applied will depend on the system used, and will refer to the instructions supplied with the instrument and kit of choice.

The method is sequential:

Step 1: Enrichment of the sample.

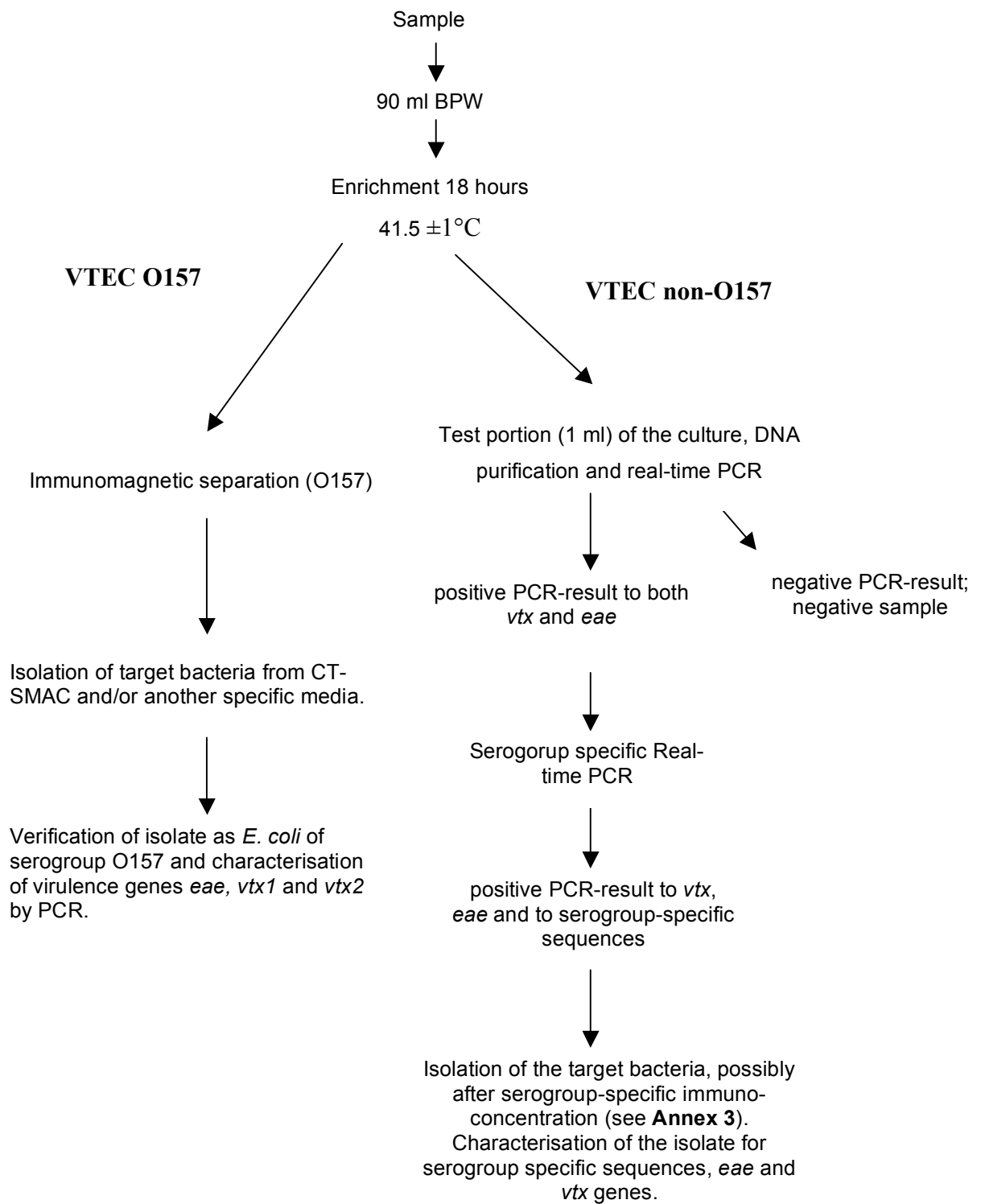
Step 2: Detection of the genes *vtx1*, *vtx2* and *eae*.

Step 3: Samples positive for both *vtx* and *eae* at the second step are tested for the serogroup-associated genes (molecular serogrouping).

Step 4: Isolation of the VTEC strain; samples positive at the same time for *vtx*, *eae*, and serogroup-associated genes are submitted to a further step aimed at isolation of the VTEC strain. This requires serogroup-specific enrichment based on IMS or other immuno-capture suitable approaches. A guideline for the isolation of the different VTEC serogroups is included as **Annex 3**.

Step 5: Characterisation of the isolate i.e. identification, detection of *vtx* genes, the *eae* gene and the serogroup gene.

**Figure 1. Flow-diagram for the detection of VTEC in cattle hide swabs**



## Annex 1

### Multiplex PCR for the characterisation of VTEC virulence genes: *vtx1*, *vtx2* and *eae*

#### 1. Principle of the method

The method is based on PCR amplification of specific DNA regions from a DNA template, with oligonucleotides triggering the start of the PCR reaction. Detection of *vtx1*, *vtx2* and *eae* is performed by a multiplex PCR reaction using specific primers (Table 1).

The primer pairs used, *stx1F/stx1R* and *stx2F/stx2R* (Paton & Paton, 1998), are able to detect the genes *vtx1* and *vtx2*, respectively. The latter recognise all the variants of *vtx2*, except *vtx2f*. The amplification of the *vtx2f* variant can be obtained by an individual primers set: 128-1/128-2 (Schmidt et al, 2000). The primers used for the detection of the intimin-coding gene *eae* (Paton & Paton, 1998) recognise all the reported polymorphic variants of this gene.

The method does not allow for the discrimination of the *vtx2* variant genes, with the exception of *vtx2f*, and is intended for use with bacterial cultures only.

The method is composed of the following steps:

- template preparation;
- setting-up of the PCR reaction;
- determination of the PCR results by agarose horizontal gel electrophoresis.

#### 2. Template preparation

Cultures streaked onto solid media (e.g. TSA) are processed as follows:

- pick a single bacterial colony up with a sterile 1 µl loop;
- prepare the template by suspending the bacteria in 100 µl of 0.22 µm filter-sterilised MilliQ water and boil for 10 minutes.

#### 3. Setting up the PCR reaction

For each sample, set up a 50 µl reaction (reaction buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, dNTPs 0.2 mM each, 50 pmoles of each primer, 2 Uts of *Taq* polymerase and 10 µl of DNA template).



The volume of the reagents can be scaled according to the final volume of reaction. MilliQ water must be used for PCR reactions.

In each PCR assay, a positive and two negative controls must be included. The positive controls are DNA templates obtained from *E. coli* strains possessing the virulence genes tested, while a negative control is the DNA from a non-pathogenic *E. coli* isolate (no virulence genes harboured) and the other is constituted by a sample without template added.

The reactions are incubated in a thermal cycler programmed with the thermal profile described by Paton & Paton (1998): 35 PCR cycles, each consisting of 1 min of denaturation at 95°C; 2 min of annealing at 65°C for the first 10 cycles, decrementing to 60°C by cycle 15; and 1.5 min of elongation at 72°C, incrementing to 2.5 min from cycles 25 to 35.

#### **4. Agarose gel electrophoresis**

Prepare a 2.5% (w/v) agarose gel in 1X Tris/Borate/EDTA (TBE) or Tris/Acetate/EDTA (TAE). Each well of the gel is loaded with 15 µl of each reaction added with loading dye at 1X final concentration. Run the samples in 1X running buffer (TBE or TAE) in constant voltage (100 V). Use a molecular weight marker suitable for the assignment of the correct molecular weights to the amplicons produced (refer to Table 1 in this appendix). Consider that a correct band assignment is a crucial point in the assessment of the presence of the virulence genes. Make sure that the bands produced by the reference strains match exactly the expected molecular weight. The use of 2.5% agarose gels is needed to get a satisfactory resolution between the bands referring to *eae* (384 bp) and *vtx2f* (428 bp) genes.

Ethidium bromide should be added to agarose gels to allow the visualisation of DNA. This reagent is a DNA intercalating agent commonly used as a nucleic acid stain in molecular biology laboratories. When exposed to ultraviolet light, it will fluoresce with a red-orange color. Ethidium bromide should be added to a final concentration of 0.5 µg/ml before pouring the agarose gel in the electrophoresis gel cast. Alternatively the agarose gel can be stained after electrophoresis in a 0.5 µg/ml ethidium bromide aqueous solution.

## **5. Reference strains**

A VTEC strain harbouring *vtx1*, *vtx2* and *eae* genes should be used as positive control for all these genes. An example is the *E. coli* O157 EDL933 reference strain (ATCC no 43895).

A VTEC strain harbouring *vtx2f* gene should be used as positive control for this gene.

Any *E. coli* K12 strain such as LE392 can be used as negative control.

PCR controls are prepared as described in section 5.2 (Template preparation). The control templates can be prepared in advance and stored in 10 µl ready-to-use aliquots at -20°C for eight months.

## **6. Interpretation of the results**

Samples showing amplification fragments of the expected size (see Table 1) are considered as positive for related target genes. Positive and negative controls must be included in each reaction and give positive and negative results, respectively.

**Table 1. Primer sequences and amplicon sizes**

Target gene	Primer Name (reference)	Primer Sequence	Amplicon Size (bp)
<i>eae</i>	<i>eae</i> AF (Paton & Paton, 1998)	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
	<i>eae</i> AR (Paton & Paton, 1998)	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>vtx1</i>	<i>stx1</i> F (Paton & Paton, 1998)	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180
	<i>stx1</i> R (Paton & Paton, 1998)	AGAACGCCCACTGAGATCATC	
<i>vtx2</i> (group)	<i>stx2</i> F (Paton & Paton, 1998)	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255
	<i>stx2</i> R (Paton & Paton, 1998)	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
<i>vtx2f</i>	128-1 (Schmidt et al. 2000)	AGA TTG GGC GTC ATT CAC TGG TTG	428
	128-2 (Schmidt et al. 2000)	TAC TTT AAT GGC CGC CCT GTC TCC	

**References**

Paton AW, Paton JC, 1998. Detection and characterisation of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. J Clin Microbiol 36, 598-602.

Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler L, Karch H, 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl. Environment Microbiol 66, 1205-1208.

## Annex 2

### Real-time PCR for detection and identification of VTEC

#### 1. Principle of the method

This Real-time PCR protocol aims at the detection and identification of the major virulence genes and serogroup-associated genes characterising the VTEC strains that are considered to be pathogenic to humans. These genes include:

- 1) *vtx* genes (*vtx1*, *vtx2* and its variants) encoding the Verocytotoxins (Shiga toxins), the main virulence factors of VTEC;
- 2) the *eae* gene, encoding a 90KDa protein, the intimin, which is the key factor for the induction of the “attaching and effacing” lesion on the enterocyte, a typical feature of the pathogenic VTEC strain;
- 3) genes associated with the VTEC serogroups that are mainly isolated from human cases of severe disease: O157, O26, O111, O103, and O145. The genes are either comprised in the operons encoding the different lipopolysaccharides (LPS) constituting the O antigens or are anyhow associated to each serogroup in a unique manner (Table 1).

#### 2. Operating procedures

The protocol is based on the 5' nuclease PCR assay. Considering that Real-time PCR may use different instruments and probes labelling chemistry, the amplification conditions to be applied may vary depending on the system used. Refer to the instructions supplied with the instrument and kit of choice.

The primers and probes to be used are listed in the tables below. The chemistry of the reporter and quencher fluorophores are not indicated being largely dependent on the Real-time PCR systems available in each laboratory.

#### 3. Controls

A VTEC strain harbouring *vtx1*, *vtx2* and *eae* genes should be used as positive control for the virulence genes. An example is the *E. coli* O157 EDL933 reference strain (ATCC no 43895). For serogroup-associated genes, reference strains belonging to each of the serogroup should be used.

The Real-time PCR procedure requires an **inhibition/extraction control**. Details on the possible systems to be used as inhibition/extraction control are given below. In particular, two different internal amplification controls (IACs) can alternatively be used:

- A commercially available TaqMan<sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The kit includes all reagents necessary (primers, a Vic<sup>™</sup> probe, IAC target DNA and blocking solution). The IAC target DNA must be diluted 10 times to achieve a copy number of approximately 100 per PCR reaction. The PCR product length is not declared to the customer.
- The open formula pUC 19 based internal amplification control IAC developed by Fricker et al. (2007. Appl Environ Microbiol 73, 1892-1898). Approximately 100 copies of target DNA (pUC 19) should be used per PCR reaction. The size of the IAC is 119 bp.

The latter may be also used as an extraction control by adding 100 copies of the pUC 19 plasmid to the sample aliquot prior to the DNA purification step.

**Table 1. Degenerate primers and TaqMan probes used in 5' nuclease PCR assays for the detection of virulence genes**

Target gene (Ref.)	Forward primer, reverse primer and probe sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Amplicon size (bp)	Location within sequence	GenBank accession number
<i>vtx1</i> (1)	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC <b>Probe-</b> CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	131	878–906 983–1008 941–971	M16625
<i>vtx2</i> (1)	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC <b>Probe-</b> TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	128	785–813 785–813 838–864	X07865
<i>Eae</i> (2)	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA <b>Probe-</b> ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	102	899-924 1000-979 966-936	Z11541

<sup>a</sup> In the sequence Y is (C, T), S is (C, G), W is (A, T), R is (A, G), M is (A, C)

(1) Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18: 185–192

(2) Møller Nielsen E. and Thorup Andersen M. J Clin. Microbiol. 2003 41: 2884-2893

(3) Perelle S. et al. J. Appl. Microbiol. 2005 98: 1162–1168

**Table 2. Primers and probes used for the amplification of O antigen-specific genes in 5' nuclease PCR assays**

Target gene (serogroup)	Forward primer, reverse primer and probe sequences (5'-3')	Amplicon size (bp) (Ref.)	Location within sequence	GenBank accession number
<i>§rfbE</i> (O157)	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT <b>Probe-</b> AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	88 (1)	348–372 412–435 381–410	AF163329
<i>§wbdI</i> (O111)	CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC <b>Probe-</b> TTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA	146 (1)	3464–3489 3579–3609 3519–3548	AF078736
<i>§wzx</i> (O26)	CGCGACGGCAGAGAAAATT AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTT <b>Probe-</b> CCCCGTAAATCAATACTATTTTCACGAGGTTGA	135 (1)	5648–5666 5757–5782 5692–5724	AF529080
<i>§ihp1</i> (O145)	CGATAATATTTACCCACAGTACAG GCCGCCGCAATGCTT <b>Probe-</b> CCGCCATTGAGAATGCACACAATATCG	132 (1)	1383–1408 1500–1514 1472–1498	AF531429
* <i>wzx</i> (O103)	CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT GAAAAAAGCACCCCGTACTTAT <b>Probe-</b> CATAGCCTGTTGTTTTAT	99 (3)	4299–4323 4397–4375 4356–4373	AY532664

(1) Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18: 185–192

(2) Møller Nielsen E. and Thorup Andersen M. J Clin. Microbiol. 2003 41: 2884–2893

(3) Perelle S. et al. J. Appl. Microbiol. 2005 98: 1162–1168

### **Annex 3:**

#### **Isolation of VTEC O26, O103, O111 AND O145 from Real-time PCR positive samples**

The Real-time PCR method proposed for the detection of VTEC belonging to the pathogenic serogroups O26, O103, O111 and O145 is based on screening samples for the presence of *vtx* (VT-coding genes), *eae* (intimin-coding gene) and specific serogroup-associated genes. Samples positive at the same time for *vtx*, *eae*, and a serogroup-associated gene must be submitted to a further step aimed at the isolation of the VTEC strain, to confirm the simultaneous presence of the genes in the same live bacterial cell.

Flow of the operations may include:

- 1) Submit the enrichment culture maintained as a back-up to serogroup-specific enrichment (SSE), using immuno-capture systems such as immuno-magnetic separation (IMS) or equivalent following instructions supplied by the manufacturer.
- 2) Streak the SSE onto Tryptone-bile-glucuronic medium (TBX) or onto a specific selective medium where available (see Note 1) and incubate for 18 to 24 hours at 37°C.
- 3) Pick from 10 to 50 colonies with *E. coli* morphology or with characteristic aspect according to the medium used (see Note 1) and point-inoculate on nutrient agar (NA) (see Note 2) and H<sub>2</sub>O (the colonies may be pooled in water up to a number of ten per pool).
- 4) Perform conventional PCR (Annex 13) or Real-Time PCR (Annex 2) on the H<sub>2</sub>O pools to assess the presence of the *vtx* and the *eae* genes.
- 5) If a PCR pool is positive, go back to NA and assay the individual colonies forming the positive pool in order to select one single positive colony.
- 6) Identify the isolates as *E. coli* and confirm the serogroup the sample was positive for in the screening PCR assay (see Note 3).

**NOTE 1:** For VTEC O26 isolation, a differential solid media (MacConkey) containing Rhamnose instead of lactose is commercially available (RMAC). It is very effective in distinguishing VTEC O26 strains, which do not ferment Rhamnose, from other *E. coli*. Differential and confirmation plating media for VTEC serotypes O26, O103, O111, O145, and sorbitol-positive and -negative O157 have been recently proposed (1, 2). Enterohaemolysin Agar can also be used. It detects Enterohaemolysin production, which is a common feature of VTEC pathogenic to humans (3).

**NOTE 2:** There are several types of nutrient agar media available commercially either ready-to-use plates or prepared in house from dehydrated powders. Every type of non-selective nutrient agar media (e.g. TSA), including Enterohaemolysin Agar, is suitable for the purpose of maintaining the colonies for further characterisation.

**NOTE 3:** Colony confirmation as *E. coli* may be achieved by using commercial biochemical galleries or by assessing the indole production. Confirmation of the serogroup the sample was positive to in the screening PCR assay may be achieved either by PCR or by agglutination with commercial antisera.

## References

1. Posse B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L, 2008b. Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol. J Appl Microbiol, 227-235.
2. Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L, 2008. Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. FEMS Microbiol Lett 282,124-131.
3. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid detection and isolation of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. J Clin Microbiol. 1996; 34:2812-4.



**Figure 1. Flow-diagram of the isolation procedure**

