

Risultati del 4° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina diversi da *E.coli* O157 (VTEC non-O157) negli alimenti - 2010

Il quarto studio inter-laboratorio (*Proficiency test*, PT) sulla ricerca e l'identificazione dei ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è stato organizzato nel 2010 dal Laboratorio Nazionale di Riferenza (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità ai fini della valutazione esterna di qualità dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti ed è stato dedicato alla ricerca di VTEC diversi da *E. coli* O157 (VTEC non-O157) in campioni di latte bovino. Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferenza (EU-RL) per questo patogeno, lo studio nazionale è stato condotto contestualmente a quello dedicato ai LLNNRR per *E. coli* degli Stati membri della UE. Quest'ultimo ha visto la partecipazione di 29 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare, rappresentanti 26 Stati Membri dell'Unione Europea, la Norvegia e la Svizzera.

1. PARTECIPANTI

Allo studio nazionale hanno partecipato 9 laboratori di 8 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS Lombardia e Emilia Romagna, Laboratorio di Microbiologia, Brescia
- IZS del Mezzogiorno, Diagnostica Biomolecolare, Portici (NA)
- IZS del Mezzogiorno, Sezione di Salerno, Fuorni (SA)
- IZS Puglia e Basilicata, Lab. Biotecnologie applicate agli alimenti e batteriologia speciale, Foggia
- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Reparto Igiene degli Alimenti, Teramo
- IZS delle Regioni Lazio e Toscana, Direzione Operativa Controllo degli Alimenti, Roma
- IZS delle Venezie, Sezione Pordenone, Cordenons (PN)

- IZS Umbria e Marche, Lab. Contaminanti Biologici PGCB,
- IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino

2. OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

Il 3° PT nazionale, condotto nel 2009, è stato dedicato alla ricerca dei cinque sierogruppi VTEC maggiormente coinvolti nelle infezioni umane (O157, O26, O103, O111 e O145) in tamponi superficiali di carcasse bovine (report disponibile [qui](#)). Il protocollo analitico era basato sulle raccomandazioni pubblicate dall'EFSA (*Guidance on the technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food*, EFSA Journal 2009; 7:1366) e prevedeva la ricerca di VTEC O157 usando il metodo colturale ISO 16654:2001 per *E. coli* O157 negli alimenti, modificato nella fase di arricchimento. La ricerca dei VTEC non-O157 costituiva la parte facoltativa del test ed è stata condotta applicando lo standard internazionale ISO/WD TS 13136: "*Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups - Qualitative Method*", in fase di approvazione in ambito ISO. Il metodo proposto prevedeva lo screening delle colture di arricchimento per la presenza di geni di virulenza e sierogruppo-specifici mediante Real-Time PCR, seguito dall'isolamento dei ceppi VTEC dai campioni risultati positivi, mediante arricchimento per immuno-concentrazione specifico per il sierogruppo identificato nella fase screening.

La partecipazione e la performance dei laboratori è stata ottima per la prima parte, riguardante la ricerca di VTEC O157. Al contrario, solo 4 laboratori hanno eseguito la parte facoltativa riguardante i VTEC non-O157.

Alla luce delle osservazioni relative al 3° PT, ed allo scopo di aumentare il numero dei laboratori in grado di eseguire correttamente il protocollo descritto dallo standard internazionale IS/WD TS 13136, il 4° PT nazionale è stato dedicato alla ricerca di VTEC non-O157 in campioni di latte bovino contaminati artificialmente. Ai laboratori è stato richiesto di ricercare i VTEC non-O157 appartenenti ai sierogruppi maggiormente coinvolti nelle infezioni umane (O26, O103, O111 e O145) utilizzando la procedura descritta nello standard ISO/WD TS 13136. (**Allegato 1**). Lo studio consisteva quindi di due fasi:

1. Screening delle colture di pre-arricchimento per la presenza di geni di virulenza e sierogruppo-specifici mediante Real-Time PCR.
2. Isolamento e caratterizzazione dei ceppi VTEC non-O157 dai campioni risultati positivi alla Real-time PCR, dopo arricchimento mediante immuno-concentrazione specifico per il sierogruppo identificato nella fase screening.

3- MATERIALI E METODI

Il set inviato ai laboratori era costituito da 2 campioni di latte (A e B) potenzialmente contaminati con VTEC non-O157 e contenenti una flora microbica di *background*.

3.1. Preparazione dei campioni

Le caratteristiche dei campioni sono riportate nella Tabella 1 e sono state considerate come “gold standard”.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di latte inclusi nello studio

Contaminante	Campione A	Campione B
VTEC O103, <i>vtx2</i> , <i>eae</i>	40 UFC/ml	0
<i>E. coli</i> ATCC35218	10 ² UFC /ml	10 ² UFC /ml
<i>E. faecium</i> ATCCL565	10 ² UFC /ml	10 ² UFC /ml

Per ogni sospensione batterica utilizzata per contaminare i campioni, è stata calcolata l'incertezza di misura associata all'inoculo, secondo quanto prescritto dalla ISO TS 19036:2006, ottenendo i seguenti valori:

- VTEC O103 *vt2*, *eae*: 0,24 log cfu/ml
- *E. faecium* ATCCL565: 0,38 log cfu/ml
- *E. coli* ATCC35218: 0,22 log cfu/ml

3.2. Stabilità e omogeneità dei campioni

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state verificate secondo quanto prescritto dalla ISO 17043:2010.

Per la verifica della stabilità, un gruppo di campioni è stato preparato appositamente il 27 Aprile 2010 con le stesse procedure utilizzate successivamente per la preparazione dei campioni da impiegare nel test. Questi campioni sono stati conservati a 5°C +/- 3°C (ISO 7218:2007) e analizzati periodicamente secondo il protocollo dello studio inter-laboratorio. Le analisi sono state effettuate nei giorni 27 e 29 Aprile e 3, 5, 10, 12, e 14 Maggio, sempre ottenendo i risultati attesi.

I campioni da impiegare nello studio inter-laboratorio sono stati preparati il 14 Maggio e la loro omogeneità è stata verificata saggiando tre set di campioni selezionati casualmente subito dopo la preparazione. I test sono iniziati il giorno stesso della preparazione e hanno prodotto i risultati attesi.

3.3. Invio dei campioni

I campioni, identificati con codici numerici a tre cifre assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio, sono stati mantenuti a 5°C +/- 3°C fino al trasferimento in contenitori refrigerati per la spedizione. Questa è stata effettuata il 17 Maggio mediante corriere. Ai laboratori è stato richiesto di registrare la data e l'ora di arrivo dei campioni e la loro temperatura, e di iniziare le analisi entro 18 ore dall'arrivo stesso.

3.4. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando pagine dedicate accessibili attraverso la *restricted area* del sito web dell'EU-RL VTEC ([link](#)), previa presentazione di *user ID* e *password*, inviate ad ogni laboratorio insieme al codice identificativo e alle istruzioni necessarie per il *log in*. Al termine del test, i partecipanti hanno avuto la possibilità di stampare direttamente il proprio *test-report* con i risultati inviati e quelli attesi.

3.5. Valutazione della performance dei laboratori

La *performance* di un laboratorio è stata valutata "soddisfacente" quando è stata riscontrata correttamente la presenza/assenza di VTEC O103 in entrambi i campioni.

Le caratteristiche di *performance* del metodo sono state valutate, limitatamente alla fase di screening mediante Real-Time PCR, 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 sensibilità diagnostica è stata definita come la proporzione di campioni positivi correttamente identificati (presenza dei geni *vtx1*, *vtx2*, *eae* e sierogruppo specifici). La specificità diagnostica è stata definita come la proporzione

di campioni negativi identificati correttamente (assenza dei geni *vtx1*, *vtx2*, *ee* e sierogruppo specifici). Per tutti i parametri è stato calcolato il relativo intervallo di confidenza (95% I.C.).

4 - RISULTATI

I campioni sono stati inviati il 17 Maggio e sono stati recapitati ai Laboratori partecipanti il giorno successivo. Per i sei laboratori che hanno riportato l'informazione, la temperatura alla ricezione era compresa tra 2°C e 6°C. Un Laboratorio (L18) non ha inviato i risultati.

La Tabella 2 riporta la valutazione della *performance* dei singoli laboratori nella determinazione della presenza/assenza di VTEC O103 nei campioni di prova.

Tabella 2. Performance dei laboratori partecipanti allo studio. Le caselle verdi evidenziano i risultati *soddisfacenti* (S) le caselle rosse i risultati *non soddisfacenti* (NS).

	Valutazione complessiva per laboratorio								
Laboratorio	L06	L07	L11	L16	L18	L26	L33	L40	L52
Valutazione	S	S	NS	NS	NS*	S	S	S	S

* Il laboratorio non ha inviato i risultati

Le caratteristiche di *performance* delle due fasi del metodo (screening delle colture di pre-arricchimento per la presenza di geni di virulenza e sierogruppo-specifici mediante Real-Time PCR e isolamento e caratterizzazione dei ceppi VTEC) sono state considerate separatamente.

4.1. Screening delle colture di pre-arricchimento per la presenza di geni di virulenza e sierogruppo-specifici mediante Real-Time PCR.

Il primo *step* del metodo ISO/WD TS 13136 prevede lo screening delle colture di pre-arricchimento per la presenza di geni di virulenza e sierogruppo-specifici mediante Real-Time PCR. Questa parte dello studio è stata effettuata correttamente da 6 degli 8 laboratori che hanno inviato i risultati (75%). Questi laboratori hanno riportato correttamente la presenza/assenza di tutti i geni target nelle colture di pre-arricchimento dei due campioni di latte. I risultati dei singoli laboratori sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati.

Lab	Identificazione dei geni in:													
	Campione A							Campione B						
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	O26	O103	O111	O145	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	O26	O103	O111	O145
Valore atteso	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L06	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L07	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L11	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L16	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L26	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L33	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L40	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L52	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Un laboratorio (L11) ha riportato erroneamente la presenza del gene O111 (risultato falso positivo) invece della presenza del gene O103 (risultato falso negativo). Un laboratorio (L16) non ha identificato la presenza del gene O103 (risultato falso negativo) e ha riportato erroneamente la presenza del gene *vtx1* (risultato falso positivo).

4.2. Isolamento di VTEC O103 dalle colture di pre-arricchimento PCR-positive

I risultati relativi a questa fase del metodo sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4. Isolamento di VTEC O103 dalle colture di pre-arricchimento Real Time PCR-positive. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati.

Laboratorio	Isolamento di VTEC O103 da:	
	Campione A	Campione B
Valore atteso	+	-
L06	+	-
L07	+	-
L11	-	-
L16	-	-
L26	+	-
L33	+	-
L40	+	-
L52	+	-

I sei laboratori che avevano identificato correttamente la presenza del gene associato al sierogruppo O103 nelle colture di pre-arricchimento hanno anche isolato correttamente il ceppo di VTEC O103 dal Campione A. I due laboratori (L11 e L16) che avevano commesso errori nella fase di screening hanno anche mancato di isolare il ceppo di VTEC O103 dal campione positivo (risultato falso negativo). Inoltre, il laboratorio L11 ha riportato l'isolamento di un VTEC O111 (risultato falso positivo).

4.3. Calcolo delle caratteristiche di *performance* del metodo

Le caratteristiche di *performance* del metodo, limitatamente alla fase analitica di screening mediante Real-Time PCR delle colture di pre-arricchimento, sono state valutate considerando sia lo studio interlaboratorio nel complesso che relativamente ai singoli laboratori. Le caratteristiche considerate erano: concordanza, sensibilità e specificità.

I valori di concordanza sono stati valutati tramite il Kappa di Cohen e sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Concordanza (Kappa di Cohen) dei risultati ottenuti nella fase di screening mediante Real-Time PCR delle colture di pre-arricchimento con i valori di gold standard. Sono indicati in verde valori di $K > 0.75$ (concordanza eccellente), in giallo i valori $0.45 < K < 0.75$ (concordanza buona).

	Valori del Kappa di Cohen per i laboratori partecipanti							
Laboratorio	L06	L07	L11	L16	L26	L33	L40	L52
Kappa	1	1	0,58	0,58	1	1	1	1

Il valore di concordanza complessivo era $K = 0,89$ (IC95%: 0,71 – 1). La maggior parte dei laboratori ha riportato una concordanza perfetta ($K=1$) con i valori di gold standard per questa fase analitica, mentre i laboratori che hanno riportato errori analitici hanno avuto comunque livelli di concordanza buoni.

I valori di sensibilità e specificità ottenuti dai singoli laboratori sono riassunti nelle Tabelle 6 e 7.

Tabella 6. Valori di sensibilità ottenuti nella fase di screening mediante Real-Time PCR delle colture di pre-arricchimento. Sono indicati in giallo i valori < 100%.

	Valori di Sensibilità per i laboratori partecipanti							
Laboratorio	L06	L07	L11	L16	L26	L33	L40	L52
Sensibilità	100%	100%	67%	67%	100%	100%	100%	100%

Tabella 7. Valori di specificità ottenuti nella fase di screening mediante Real-Time PCR delle colture di pre-arricchimento. Sono indicati in giallo i valori < 100%.

	Valori di specificità per i laboratori partecipanti							
Laboratorio	L06	L07	L11	L16	L26	L33	L40	L52
Specificità	100%	100%	91%	91%	100%	100%	100%	100%

I valori complessivi di sensibilità e specificità sono stati rispettivamente del 92% (IC95% 81% - 100%) e del 98% (IC95% 95% - 100%).

5. Considerazioni

1. Il numero di laboratori che hanno partecipato allo studio utilizzando il metodo ISO/WD TS 13136 per la ricerca dei VTEC appartenenti ai 5 principali sierogruppi patogeni per l'uomo è aumentato sensibilmente rispetto allo studio del 2009 (9 vs 4).
2. Sei degli 8 laboratori che hanno inviato i risultati (75%) hanno effettuato correttamente le analisi richieste ottenendo una valutazione soddisfacente.
3. Entrambi i laboratori che hanno prodotto risultati sbagliati hanno commesso errori nella prima fase di screening molecolare del metodo. Questi errori hanno pregiudicato la corretta esecuzione della seconda fase di isolamento del ceppo VTEC.
4. La maggior parte dei laboratori ha riportato una performance analitica eccellente (K=1)
5. L'invio diretto dei dati via web ha favorito la raccolta e l'elaborazione dei risultati.
6. Questo studio ha confermato che il metodo ISO/WD TS 13136 basato sullo screening mediante Real-time PCR delle colture di pre-arricchimento rappresenta uno strumento robusto per la ricerca dei VTEC non-O157 negli alimenti.

Allegato 1



European Union Reference Laboratory for *E.coli*
Department of Veterinary Public Health and Food Safety
Unit of Foodborne Zoonoses and Veterinary Epidemiology
Istituto Superiore di Sanità



4th Inter-laboratory study on Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): detection and identification in milk samples

Laboratory procedure

The method to be used is the ISO-CEN draft Technical Specification “Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups - Qualitative Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based Method”. This method has been developed by the “STEC *ad hoc* Group” within the WG 6 of 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, followed by the isolation of the VTEC strains responsible for the positive PCR reactions.

The method is applied to an enrichment culture performed by adding a test portion of 25 ml of the milk sample to 225 ml of mTSB containing 12 mg/l Acriflavin, and incubating for 18 -24 h at 37°C ± 1°C (see **Flow diagram** below). 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 included as **Annex 1**. 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.

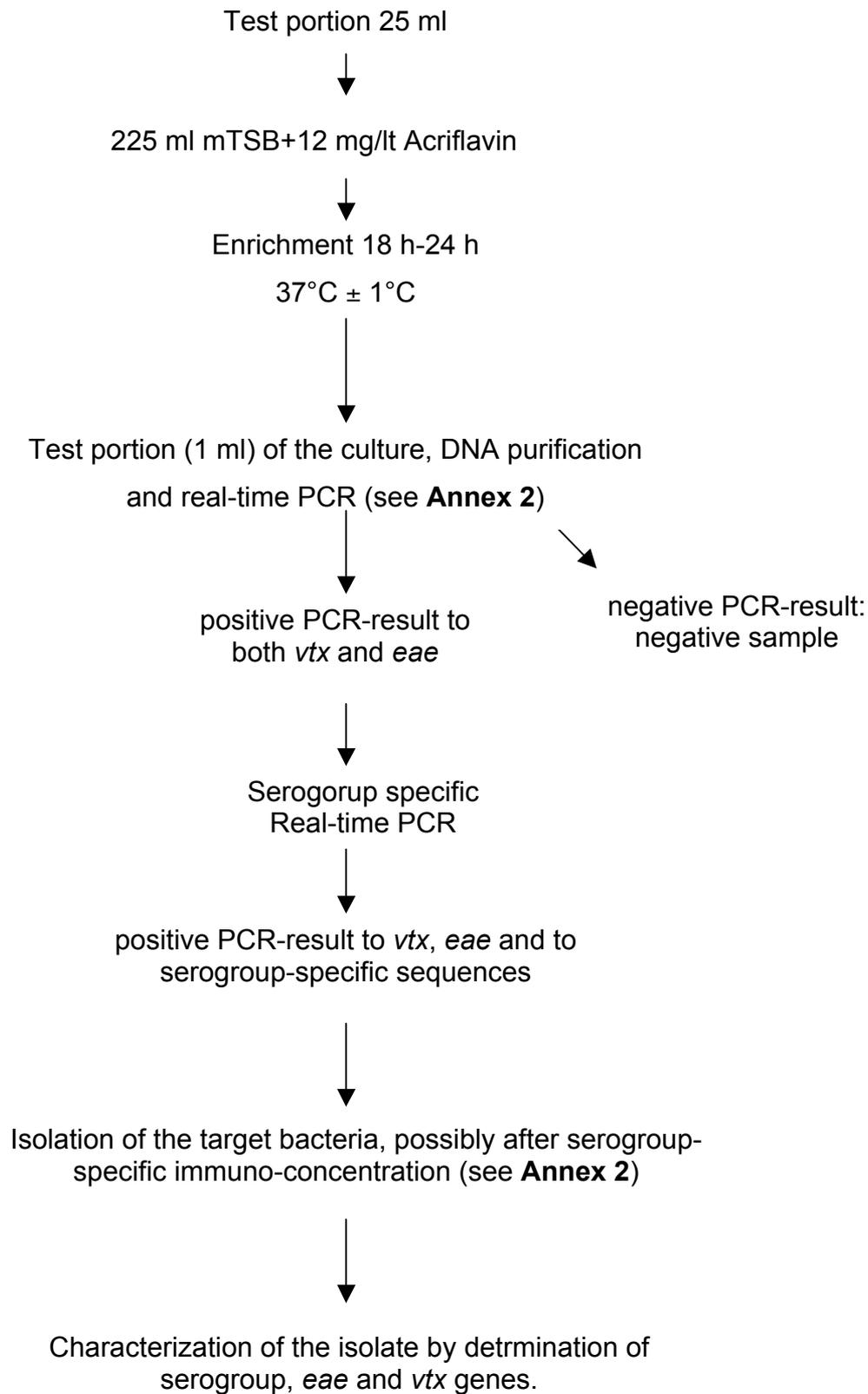
Step 2: Detection of the genes *vtx1*, *vtx2* and *eae*.

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 2**.

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

Flow-diagram for the detection of VTEC non-O157 in milk samples



Annex 1

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[®] Exogenous Internal Positive Control (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The kit includes all reagents necessary (primers, a Vic[™] 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') ^a	Amplicon size (bp)	Location within sequence	GenBank accession number
<i>vtx1</i> (1)	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Probe- CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	131	878–906 983–1008 941–971	M16625
<i>vtx2</i> (1)	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Probe- 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 Probe- ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	102	899-924 1000-979 966-936	Z11541

^a 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 Probe- AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	88 (1)	348–372 412–435 381–410	AF163329
<i>§wbdI</i> (O111)	CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC Probe- TTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA	146 (1)	3464– 3489 3579– 3609 3519– 3548	AF078736
<i>§wzx</i> (O26)	CGCGACGGCAGAGAAAATT AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTTT Probe- CCCCGTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	135 (1)	5648– 5666 5757– 5782 5692– 5724	AF529080
<i>§jhp1</i> (O145)	CGATAATATTTACCCCACCAGTACAG GCCGCCGCAATGCTT Probe- CCGCCATTCAGAATGCACACAATATCG	132 (1)	1383– 1408 1500– 1514 1472– 1498	AF531429
* <i>wzx</i> (O103)	CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT GAAAAAAGCACCCCGTACTTAT Probe- 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 2:

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 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 H₂O (the colonies may be pooled in water up to a number of ten per pool).
- 4) Perform conventional PCR or Real-Time PCR on the H₂O 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

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.

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.

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

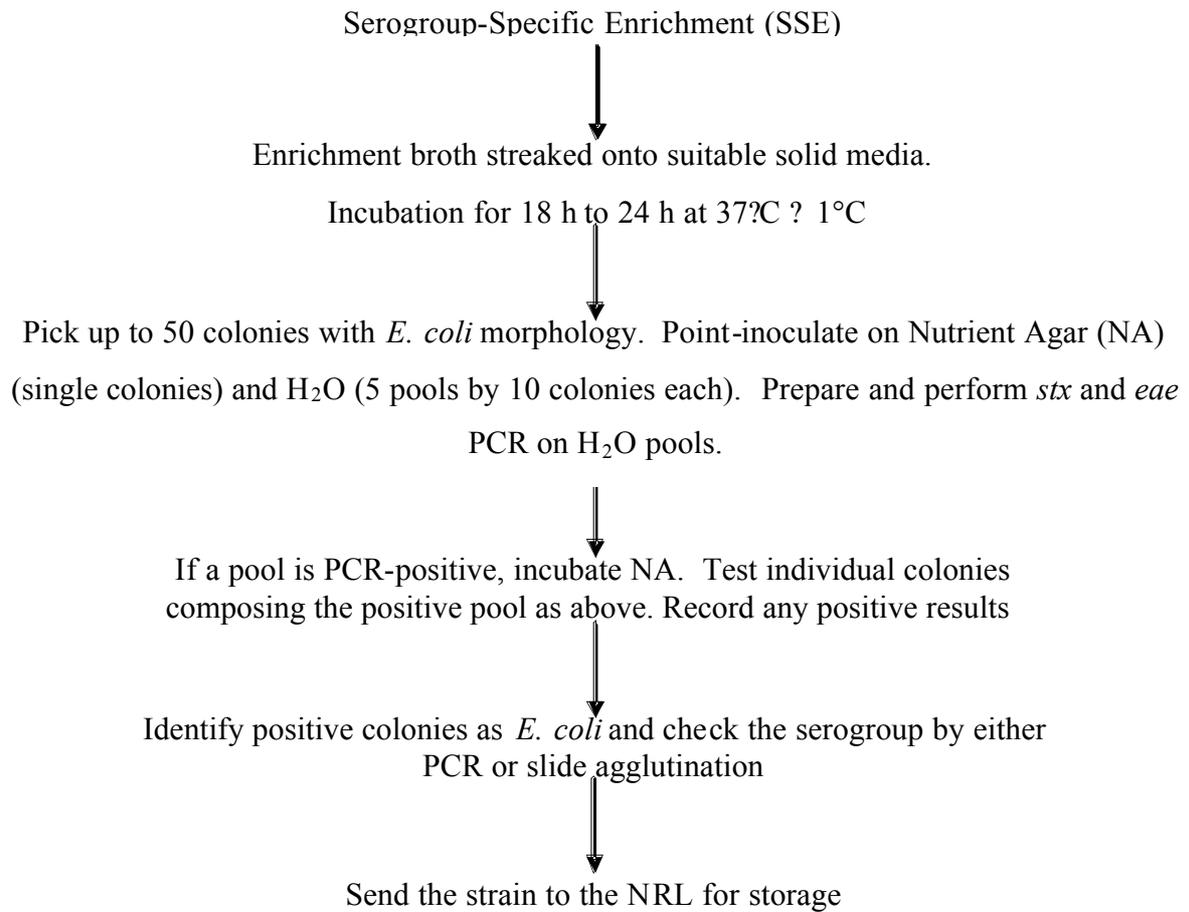


Figure 1. Flow-diagram of the isolation procedure

