



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

IDENTIFICAZIONE DI VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS MEDIANTE RICERCA DEL GENE *toxR*

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2. RIFERIMENTI	2
3. PRINCIPIO DEL METODO	2
4. TERRENI DI COLTURA, REAGENTI E MATERIALI	3
5. PROCEDIMENTO	7
6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI	10
7. COLLOCAZIONE	Errore. Il segnalibro non è definito.
8. DESTINATARI	Errore. Il segnalibro non è definito.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Metodo per l'identificazione di *Vibrio parahaemolyticus*. Tale metodo si applica a ceppi isolati presuntivamente identificati come *V. parahaemolyticus*.

2. RIFERIMENTI

- Food Drug Administration (FDA) – Bacteriological Analytic Manual 8th Edition/1995, capitolo 9 (versione maggio 2004)
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J Clin Microbiol. 1999 Apr; 37(4):1173-7

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo si articola in quattro fasi.

La prima fase prevede la coltura in brodo del ceppo batterico.

La seconda fase comprende l'estrazione del DNA.

La terza fase riguarda la ricerca mediante PCR della sequenza del gene *toxR* specifica per la specie *V. parahaemolyticus*.

L'ultima fase consiste nella visualizzazione dei risultati di PCR mediante gel elettroforesi.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

4. TERRENI DI COLTURA, REAGENTI E MATERIALI

Tryptone soya broth (TSB) salino

triptone (digerito pancreatico di caseina)	g	17
fitone (digerito papaico di farina di soia)	g	3
cloruro di sodio	g	30
fosfato di potassio monoacido	g	2.5
destrosio	g	2.5
acqua distillata	ml	1000
pH 7.3		

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min

Tryptone soya broth (TSB)

triptone (digerito pancreatico di caseina)	g	17
fitone (digerito papaico di farina di soia)	g	3
cloruro di sodio	g	5
fosfato di potassio monoacido	g	2.5
destrosio	g	2.5
acqua distillata	ml	1000
pH 7.3		

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min

Acqua distillata sterile

Acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min

TE buffer

Tris-Cl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM
pH 8.0	

A 10 ml di soluzione Tris-Cl 1 M, pH 8.0 aggiungere 2 ml di soluzione EDTA 0.5 M, pH 8.0. Portare il volume a 1000 ml con acqua distillata. Verificare il pH finale della soluzione (effettuare eventuali correzioni del pH mediante aggiunta di HCl o NaOH concentrati).

Tris-Cl [tris(idrossimetil)aminometano] 1M, pH 8.0

Dissolvere 121 g di Tris in 800 ml di acqua; aggiustare a pH 8.0 con HCl concentrato; portare a volume

EDTA (etilendiamina tetracetic acid) 0.5 M, pH 8.0

Sciogliere 186.1 g di Na₂EDTA·2H₂O in 700 ml di acqua; aggiustare a pH 8.0 con NaOH 10M (necessari circa 50 ml); portare a volume



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

SDS (sodio dodecil sulfato) 10% (w/v)

SDS	g	10
acqua distillata	ml	100

proteinase K (20 mg/ml)

Dissolvere 20 mg di proteinase K in 1 ml di acqua distillata sterile (o, nel tampone indicato nelle istruzioni relative al prodotto). Suddividere la sospensione in aliquote e conservare a -20°C. Evitare ripetuti scongelamenti

NaCl 5M

NaCl	g	292
acqua distillata	ml	1000

soluzione CTAB (esadeciltrimetilammoniobromide) / NaCl

CTAB	10%
NaCl	0.7 M

Sciogliere 4.1 g di NaCl in 80 ml di acqua e lentamente aggiungere 10 g di CTAB scaldando e agitando. Se necessario riscaldare fino a 65°C per dissolvere. Aggiustare il volume a 100 ml.

Soluzione Cloroformio – Alcool isoamilico

Mescolare 24 ml di cloroformio con 1 ml di alcool isoamilico.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

Soluzione Fenolo - Cloroformio – Alcool isoamilico

Mescolare 25 ml di fenolo tamponato (pH ~ 8.0) con 24 ml di cloroformio e con 1 ml di alcool isoamilico.

Fenolo tamponato

Per la purificazione del DNA il fenolo deve essere ridistillato prima dell'uso perché i prodotti di ossidazione del fenolo possono danneggiare ed introdurre rotture nella catene di acidi nucleici. Il fenolo ridistillato è disponibile commercialmente. A prescindere dalla sua origine, tuttavia, il fenolo deve essere tamponato prima dell'uso. Preparazioni contenenti fenolo e soluzioni tamponanti sono altresì disponibili commercialmente.

CAUTELE: il fenolo può causare serie ustioni della pelle e danni agli indumenti. Guanti (possibilmente doppi), occhiali protettivi e camice dovrebbero essere indossati quando si lavora con il fenolo e tutte le manipolazioni dovrebbero essere effettuate sotto cappa. Un recipiente apposito dovrebbe essere disponibile esclusivamente per lo scarico di fenolo e cloroformio.

Preparazione :

- aggiungere 0.5 g di 8-hydroxyquinoline in un beker da 2 litri con magnete agitatore
- versare 500 ml di fenolo liquido o di cristalli discolti di fenolo ridistillato (il fenolo diventerà giallo con l'aggiunta di 8-hydroxyquinoline)
- aggiungere 500 ml di Tris-Cl 50 mM (pH non modificato ~ 10.5)
- coprire il beker con alluminio e mantenere in agitazione a bassa velocità a TA
- lasciar separare le due fasi a TA; decantare delicatamente la fase acquosa superiore in uno scarico adatto; rimuovere ciò che non è possibile decantare con una pipetta
- aggiungere 500 ml di Tris-Cl 50 mM pH 8.0 e ripetere le operazioni di agitazione, separazione e decantazione fino ad ottenere un pH del fenolo pari a 8.0 (saranno necessarie almeno 2 o 3 ripetizioni con Tris-Cl 50 mM pH 8.0)
- aggiungere 250 ml di Tris-Cl 50 mM pH 8.0 e conservare max 2 mesi a 4°C riparando dalla luce (bottiglia scura o bottiglia avvolta con alluminio)
- per l'uso nella purificazione del DNA utilizzare la fase inferiore della preparazione, caratterizzata dal colore giallo

Isopropanolo

Etanolo 70%

etanolo puro	ml	70
acqua distillata	ml	30
oppure		
etanolo 96%	ml	72.9
acqua distillata	ml	27.1



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

Buffer & DNA polimerasi

MgCl₂

dNTPs

deossiadenosina 5'-trifosfato (dATP)

deossicitidina 5'-trifosfato (dCTP)

deossiguanosina 5'-trifosfato (dGTP)

deossitimidina 5'-trifosfato (dTTP)

Acqua tridistillata sterile DNase-RNase free

Primers

primer | **sequenza**

senso	5' - GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG – 3'
antisenso	5' - ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG – 3'

TBE 1X

Diluire il TBE 5X in acqua distillata in rapporto 1:4

TBE 5X

Tris	g	54
Acido Borico	g	27.5
EDTA 0.5 M pH 8	ml	10
Acqua tridistillata q.b.	ml	1000

Agarosio in polvere per elettroforesi

Bromuro d'etidio (in soluzione)

Dissolvere il bromuro d'etidio secondo le indicazioni del produttore. Aggiungere 5 µl ogni 100 ml di gel elettroforetico.

Soluzione colorante per elettroforesi (6X)

Glicerolo	ml	30
Bromofenolo blu	g	0,25
Xylene cyanolo	g	0,25
Acqua distillata	ml	100

Aggiungere il colorante all'amplificato in rapporto 1:5

Marker



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

Ladder da 100bp o 50 bp. Altre dimensioni sono accettabili purchè il range della scala comprenda l'ampiezza attesa per il frammento da amplificare.

5. PROCEDIMENTO

5.1 - *Coltura del ceppo batterico*

Passare il/i ceppo/i batterico/i da sottoporre ad analisi in una provetta contenente terreno TSB salino. Allestire contestualmente la coltura di un ceppo di riferimento proveniente da collezione internazionalmente riconosciuta con funzione di controllo positivo (e.g. *V. parahaemolyticus* della collezione ATCC; specificare nelle annotazioni relative alla prova il ceppo utilizzato).

Incubare la coltura del/i ceppo/i da sottoporre a prova, del controllo positivo e una provetta di terreno non inoculato (controllo negativo) a 30°C per 18-24 h.

In caso di necessità (urgenza del risultato analitico), il periodo di incubazione del ceppo batterico può essere abbreviato a 6-8 h. Menzionare tale modifica nelle annotazioni relative alla prova.

n.b. qualora il procedimento di identificazione non sia applicato a ceppi batterici di origine ambientale/alimentare (es. isolamenti di origine clinica) è preferibile l'utilizzo di un terreno non salino (TSB).

5.2 - *Estrazione del DNA*

L'estrazione del DNA batterico può essere condotta indifferentemente mediante i metodi riportati ai punti 5.2.1, 5.2.2 o 5.2.3 secondo le disponibilità del Laboratorio. Il Laboratorio fa menzione del metodo scelto nelle annotazioni relative alla prova.

Effettuare l'estrazione del DNA contestualmente sul/sui campione/i da analizzare, sul ceppo con funzione di controllo positivo, e sul controllo negativo.

5.2.1 *Metodo della bollitura*

- trasferire 1 ml di brodocoltura in una eppendorf da 1.5 ml identificata con nome/numero del ceppo batterico sottoposto ad identificazione
- centrifugare la coltura a 15000 g (~ 13000 rpm) per 5 min
- eliminare il sovraccarico e risospingere il pellet batterico in 1 ml di acqua distillata sterile
- ripetere la centrifugazione (5 min a 15000 g) e risospingere completamente il pellet in 200 µl di acqua distillata sterile
- sigillare la eppendorf mediante parafilm e porla in bagnomaria a 100 °C per 10 min
- centrifugare a 15000 g (~ 13000 rpm) per 1 min per far depositare la parte più grossolana del lisato cellulare
- riprendere il sovraccarico e trasferirlo in altra eppendorf identificata con nome/numero del ceppo batterico
- diluire il lisato aggiungendo 300 µl di acqua distillata sterile



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

- conservare a -20°C fino all'esecuzione della PCR

5.2.2 Metodo proteinase K – CTAB

- trasferire 1 ml di brodocoltura in una eppendorf da 1.5 ml identificata con nome/numero del ceppo batterico sottoposto ad identificazione
- centrifugare la coltura a 15000 g (~ 13000 rpm) per 5 min
- eliminare il sovranatante e risospendere il pellet batterico in 1 ml di acqua distillata sterile
- ripetere la centrifugazione (5 min a 15000 g) e risospendere completamente il pellet in 567 µl di TE
- aggiungere 30 µl di SDS 10% e 3 µl di proteinase K (20 mg/ml) e mixare pipettando ripetutamente
- incubare in b.m. 1 ora a 37°C
- aggiungere 100 µl di NaCl 5M e vortexare
- aggiungere 80 µl di soluzione CTAB/NaCl e vortexare
- incubare in b.m. 10 min a 65°C
- aggiungere alla sospensione un ugual volume di cloroformio/alcool isoamilico e vortexare
- centrifugare 5 min a 9000 g (~ 10000 rpm)
- trasferire il sovranatante in una nuova eppendorf da 1.5 ml identificata con nome/numero del ceppo batterico (se è difficile rimuovere il sovranatante, rimuovere prima l'interfaccia utilizzando un ago/ansa sterile)
- aggiungere alla sospensione un ugual volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico e vortexare
- centrifugare 5 min a 9000 g (~ 10000 rpm)
- trasferire il sovranatante in una nuova eppendorf identificata con nome/numero del ceppo batterico
- aggiungere 0.6 volumi di isopropanolo e mescolare gentilmente finché il DNA precipita
- trasferire il precipitato in una nuova eppendorf utilizzando una pipetta Pasteur sterile o, in alternativa, centrifugare 5 min a 9000 g (~ 10000 rpm) ed allontanare per aspirazione l'isopropanolo
- lavare il DNA precipitato con 1 ml di etanolo 70%
- centrifugare 5 min a 9000 g (~ 10000 rpm)
- allontanare il sovranatante ed asciugare in liofilizzatore fino a completa rimozione dell'etanolo
- risospendere il DNA in 100 µl di TE buffer

5.2.3 Kit commerciali per l'estrazione del DNA da batteri

Kit commercialmente disponibili per l'estrazione del DNA da batteri possono essere utilizzati in questa fase qualora il Responsabile dell'analisi lo ritenga preferibile.

Procedere secondo quanto indicato dal produttore nelle istruzioni.



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

5.3 – PCR

- per ogni campione e controllo di reazione (positivo e negativo) preparare in una eppendorf di volume adeguato una mix di PCR così composta:

buffer	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0.2 mM
primer senso	0.4 µM
primer antisenso	0.4 µM
DNA polimerasi	1.25 U
Acqua tridistillata sterile	q.b. a 45 µl

Calcolare i volumi necessari per una singola reazione e moltiplicare i volumi per n+3 (dove n = n° di campioni). Tale calcolo consente di preparare una quantità di mix di PCR sufficiente per i campioni e per i due controlli, compensando le eventuali inesattezze volumetriche del pipettaggio.

- distribuire 45 µl di mix in ciascuna eppendorf per PCR su cui sono stati precedentemente riportati i dati identificativi del ceppo batterico da esaminare oppure le indicazioni c+ (controllo positivo) o c- (controllo negativo).
- aggiungere alla mix di PCR 5 µl di DNA estratto secondo quanto descritto al § 5.2. Qualora le modalità operative del termociclatore in uso lo richiedano, aggiungere nella eppendorf, sopra ogni miscela di reazione, uno strato di olio minerale
- incubare alle seguenti condizioni:
 - 94°C per 5'
 - 20 cicli: 94°C per 1'
63°C per 1'30"
temperatura ottimale della DNA polimerasi scelta per 1'30"
 - temperatura ottimale della DNA polimerasi scelta per 7'
 - 4°C fino all'esecuzione dell'elettroforesi

n.b. Qualora si disponga dei reagenti nella forma successivamente indicata il procedimento può essere applicato come segue: per ogni campione e controllo di reazione (positivo e negativo) preparare in una eppendorf di volume adeguato una mix di PCR così composta:

buffer 10X	5	µl
MgCl ₂ (50mM)	2	µl
dNTPs (10mM)	1	µl
primer senso (10µM)	2	µl
primer antisenso (10µM)	2	µl
Taq DNA polimerasi (5U/µl)	0.25	µl
Acqua tridistillata sterile	32.75	µl

Procedere come sopra indicato ed incubare alle seguenti condizioni:



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle
contaminazioni virali dei molluschi bivalvi
Direttore: dott.ssa Luciana Croci

- 94°C per 5'
- 20 cicli: 94°C per 1'
63°C per 1'30"
72°C per 1'30"
- 72°C per 7'
- 4°C fino all'esecuzione dell'elettroforesi

- preparare un gel di agarosio all'1.5% in TBE colorato con bromuro d'etidio
- preparare i prodotti di PCR per il caricamento mescolandoli con il colorante per l'elettroforesi
- caricare i prodotti della PCR annotando su carta la disposizione relativa dei campioni e dei controlli
- caricare il marker di peso molecolare
- effettuare la corsa elettroforetica a 90 V per 30 min
- osservare l'amplificato al transilluminatore U.V. e valutare attentamente l'ampiezza dei frammenti mediante confronto con il marker di peso molecolare e con il controllo positivo della reazione di PCR
- documentare fotograficamente il risultato

5.4 - Interpretazione dei risultati

L'amplificato atteso per la reazione di ricerca del gene *toxR* in *V. parahaemolyticus* è di 368 bp. La presenza di un frammento di queste dimensioni indica positività alla ricerca della sequenza di *toxR* specifica per *V. parahaemolyticus*. L'assenza di qualunque amplificazione o la presenza di un frammento di altre dimensioni indica negatività alla ricerca della medesima sequenza.

La determinazione è da ritenersi valida qualora il controllo positivo presenti un amplificato delle dimensioni attese e il controllo negativo non presenti alcuna amplificazione.

n.b. Altre specie di *Vibrio* (tra cui ad es. *V. vulnificus*) possono produrre occasionalmente amplificati di dimensioni simili a quello atteso. Qualora sorgano dubbi nell'interpretazione delle dimensioni degli amplificati proseguire la corsa elettroforetica a 90 V per ulteriori 20 min e ricontrillare la corrispondenza o divergenza del frammento presente rispetto alle dimensioni attese.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La positività all'analisi come descritta nella presente procedura indica l'appartenenza del ceppo batterico testato alla specie *V. parahaemolyticus*; tale risultato è espresso come "identificazione del ceppo come *V. parahaemolyticus*".

La negatività all'analisi come descritta nella presente procedura indica l'appartenenza del ceppo batterico testato a specie differenti da *V. parahaemolyticus*; tale risultato è espresso come "identificazione del ceppo ... come specie diversa da *V. parahaemolyticus*".