



Ricerca di *E. coli* produttore di Shiga-tossina (STEC) e identificazione dei sierogruppi maggiormente associati ad infezioni umane - Metodo di screening

Scopo e campo di applicazione

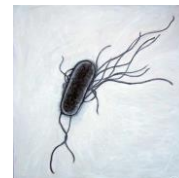
I ceppi di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina (STEC) patogeni per l'uomo possiedono geni codificanti le Shiga-tossine (Stx) di tipo 1 e/o di tipo 2 (*stx1* e *stx2*) e producono la tossina stessa; inoltre, alcuni ceppi STEC possiedono anche il gene *eae* che codifica il fattore di adesione intima, responsabile del meccanismo di adesione alla mucosa intestinale dell'ospite denominato "attaching/effacing". Tra i ceppi in grado di causare malattia grave nell'uomo, molti appartengono ai sierogruppi O157, O26, O111, O103 ed O145 (Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) - Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types, 2007; Technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food, 2009).

Lo scopo del presente protocollo è l'identificazione della presenza dei geni *stx1*, *stx2* (tutti i sottotipi eccetto la *stx2f*), *eae*, e dei geni associati ai sierogruppi O157, O26, O111, O103 e O145 tramite la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR) in campioni clinici costituiti da DNA estratto da colture batteriche di origine fecale (campioni fecali e colture batteriche come singoli isolati o colture miste). Questo protocollo corrisponde alla sola fase di screening del metodo standard ISO TS 13136:2012 "Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups".

L'identificazione degli STEC nelle matrici analizzate, ottenuta con il presente protocollo, è presuntiva, in quanto per la conferma della presenza di STEC deve essere eseguita anche la fase di isolamento finalizzata alla verifica della presenza simultanea di tutti i target nella stessa cellula batterica vitale.

Descrizione del protocollo

Il metodo è basato sul principio dell'amplificazione specifica di una sequenza di DNA a partire da oligonucleotidi di sintesi complementari alle estremità della sequenza stessa, che funzionano da innesco per una reazione di polimerizzazione in vitro per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR). Inoltre vengono utilizzate anche sonde disegnate all'interno della regione amplificata, necessarie per la rilevazione. Infatti l'amplificazione è visualizzata in tempo reale (Real Time PCR, RT-PCR) mediante rilevazione attraverso un fotomoltiplicatore della fluorescenza



emessa da sonde coniugate con fluorofori omologhe ai target. La fluorescenza è emessa a ogni ciclo di amplificazione in seguito a degradazione della sonda ogni volta che viene sintetizzata una nuova copia di DNA.

La presente procedura prevede la ricerca dei geni codificanti le Stx e l'intimina utilizzando gli oligonucleotidi e le sonde descritte nell'Appendice 1.

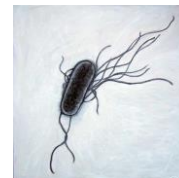
Il protocollo descritto è sequenziale: in caso di positività del campione alla presenza dei geni *stx1* e/o *stx2* unitamente al gene *eae*, si procede all'identificazione del sierogruppo tramite l'amplificazione di regioni geniche associate ai principali sierogruppi STEC: O157, O26, O111, O103 e O145. Gli oligonucleotidi e le sonde utilizzate per questa indagine sono descritte nella tabella in Appendice 1.

La metodica si articola in tre fasi principali successive:

- Preparazione del campione
- Preparazione del DNA stampo da utilizzare per la reazione di PCR
- Allestimento delle reazioni di amplificazione

Preparazione del campione:

- Campioni fecali: un'aliquota corrispondente alla quantità prelevata con un'ansa monouso da 10 µl viene inoculata in 9 / 10 ml di brodo nutriente (TSB). Le colture liquide sono incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h. Le brodocolture vengono quindi immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito.
- Colture batteriche e ceppi batterici:
Infissioni in agar molle, strisci su piastre o "becchi di clarino": prelevare il campione in asepsi con un'ansa da 1 µl e seminarlo in 9 / 10 ml di terreno nutriente liquido (TSB). Incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le colture vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte in seguito.
Piastre di primo isolamento: prelevare il campione in asepsi con un'ansa sterile da 1 µl parte della patina batterica dalla zona di maggiore crescita (scarico) e inoculare in 9 / 10 ml di terreno nutriente liquido (TSB). Incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 h.
- Tamponi di prelievo: prelevare il tampone in asepsi e seminarlo direttamente in 9 / 10 ml di terreno liquido nutriente (TSB). Incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le colture vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito.

**Preparazione del DNA stampo per la reazione di RT-PCR:**

Prelevare 1 ml dalla brodocoltura di arricchimento e procedere all'estrazione del DNA con un prodotto commerciale basato sull'utilizzo di resine non-immobilizzate (es. Instagene Matrix Bio-Rad) secondo il protocollo descritto dal produttore. Il DNA così preparato viene utilizzato come stampo per le successive analisi di RT-PCR, descritte di seguito. L'acido nucleico viene sempre diluito 1:10 prima dell'utilizzo.

Allestimento delle reazioni di amplificazione:

Le reazioni di RT-PCR possono essere condotte mediante l'utilizzo di strumenti per RT-PCR a sistema chiuso o aperto, e cioè, rispettivamente, mediante l'impiego di kit commercializzati dalla ditta di produzione dello strumento in cui i reagenti sono pre-assemblati, oppure mediante l'allestimento in laboratorio a partire dai singoli reagenti (Appendice 1).

Di seguito vengono descritte le operazioni da effettuare per allestire le reazioni utilizzando uno strumento di RT-PCR a sistema aperto.

Le reazioni per l'identificazione dei geni *stx1* e *stx2* vengono condotte in multiplex, unitamente al controllo interno di amplificazione (IAC). In particolare gli oligonucleotidi utilizzati come primers per queste reazioni hanno una sequenza degenerata disegnata appositamente per consentire l'amplificazione di entrambi i geni *stx1* e *stx2*, mentre la capacità di distinguere tra i due geni è garantita dall'utilizzo di sonde oligonucleotidiche diverse all'interno della stessa reazione.

Per quanto riguarda gli altri target, vengono amplificati uno alla volta, insieme al controllo interno di amplificazione. Qui di seguito è descritto l'allestimento delle reazioni con un metodo IAC dalla formula aperta (Fricker et al. 2007) i cui dettagli sono descritti in appendice (Appendice 2), ma è possibile utilizzare in alternativa altri sistemi di controlli interni di amplificazione disponibili in commercio.

Per le reazioni viene utilizzata una mastermix commerciale contenente il buffer di reazione, i dNTP la *Taq* polimerasi e il cofattore $MgCl_2$ (concentrazione finale ottimale di $MgCl_2$ pari a 3 mM). Le reazioni vengono allestite in 20 μ l totali per ciascun campione, analizzato in duplicato, e sono composte come segue:

Mix per campione (<i>stx1/stx2</i>)	Volume (Concentrazione finale)
Mastermix di reazione	X μ l (1X)
Primer <i>stx</i> FWD (20 μ M)	1 μ l (1 μ M)
Primer <i>stx</i> REV (20 μ M)	1 μ l (1 μ M)
Sonda <i>stx1</i> (es. Marcata in FAM) (10 μ M)	0.4 μ l (200 nM)



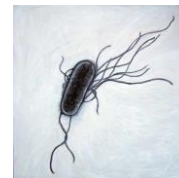
Sonda <i>stx2</i> (es. Marcata in ROX) (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
IAC FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
IAC REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Sonda IAC (es. Marcata in HEX) (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
DNA test	2 µl
pUC19 (DNA di controllo interno) (5 copie / µl)	2 µl
Acqua	Fino a 20 µl

Mix per campione (tutti gli altri target)	Volume (Concentrazione finale)
Mastermix di reazione	X µl (1X)
Primer FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Primer REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Sonda (es. Marcata in FAM) (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
IAC FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
IAC REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Sonda IAC (es. Marcata in HEX) (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
DNA test	2 µl
pUC19 (DNA di controllo interno) (5 copie / µl)	2 µl
Acqua	Fino a 20 µl

Viene allestita una miscela di reazione unica preparata tenendo conto del numero totale dei campioni da saggiare e del fatto che devono essere testati in duplicato, sottraendo il volume del DNA stampo. Per preparare la miscela di reazione unica e si esegue questo calcolo:

- Il volume indicato di ogni componente della mix per campione viene moltiplicato per 2.5 (campioni analizzati in duplicato)
- Il volume indicato di ogni componente della mix per duplicato, tranne i volumi dei DNA test e del DNA di controllo interno, viene moltiplicato per il numero totale di campioni più 0.5 (campioni.5) o 1 (ad esempio per 10 campioni si moltiplica x10.5 o x11)
- Prelevare 40 µl dalla mix unica e dispensarli in tanti microtubi quanti sono i campioni
- Aggiungere ad ogni tubo 5 µl di DNA test e 5 µl di DNA di controllo interno, prelevare per due volte un volume pari a 20 µl e inserirlo in altrettanti tubi per RT-PCR.

Per la preparazione delle soluzioni stock e di lavoro degli oligonucleotidi e delle sonde, si rimanda all'Appendice 3.



Nel corso di ciascuna sessione analitica vengono inoltre aggiunti un controllo positivo (DNA di stipiti di riferimento estratti con lo stesso metodo descritto per i campioni di origine fecale) e un controllo negativo costituito da acqua sterile al posto di DNA test (No Template Control, NTC). In seguito all'allestimento delle reazioni, procedere con l'amplificazione mediante RT PCR. Impostare sullo strumento il seguente profilo termico per tutti i target tranne il gene associato al sierogruppo O103:

1. 5 min a 95 °C
2. 15 sec a 95 °C
3. 60 sec a 60 °C

Ripetere punti 2 e 3 per 40 volte.

Il profilo termico per l'amplificazione del gene associato al sierogruppo O103 è il seguente:

1. 5 min a 95 °C
2. 15 sec a 95 °C
3. 60 sec a 55 °C

Ripetere punti 2 e 3 per 40 volte.

Inserire la lettura della fluorescenza dopo il punto 3 in tutti i canali corrispondenti alla lunghezza d'onda di emissione dei fluorofori utilizzati (es: FAM: verde, ROX: arancione; HEX: giallo)

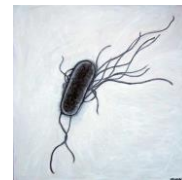
Materiali di riferimento

I materiali di riferimento sono costituiti dal DNA estratto dai ceppi batterici di riferimento, utilizzando la stessa metodica impiegata per l'estrazione del DNA dei campioni oggetto della prova.

Stipiti di riferimento con le caratteristiche genetiche identificate dal presente protocollo sono messi a disposizione dall'Istituto Superiore di Sanità su richiesta.

Sicurezza e d.p.i.

E. coli O157:H7 ha una dose infettante molto bassa e sono segnalati casi di infezione contratta in laboratorio; è perciò necessario il rigoroso rispetto delle buone pratiche di laboratorio in tutte le fasi della procedura. Inoltre gli isolati di *E. coli* produttori di verocitotossina sono inseriti nell'allegato XLVI del D. Lgs. 9 Aprile 2008, n. 81 - Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro (testo consolidato) come patogeni appartenenti alla classe di rischio 3**, pertanto nel manipolare colture



pure è raccomandato l'uso dei dispositivi di contenimento previsti dall'allegato XLVII della suindicata normativa e di protezione individuali quali camice e guanti in lattice monouso.

Interpretazione ed espressione dei risultati

Il campione di prova positivo presenta un incremento di fluorescenza all'aumentare dei cicli di amplificazione, relativamente al canale del gene target. La eventuale presenza di amplificazione nei controlli negativi, nello stesso canale del gene target, comporta la ripetizione della RT-PCR. Controllare che non vi sia inibizione nei campioni testati, esaminando le amplificazioni relative al controllo interno di amplificazione. Nel caso della RT PCR effettuata con sistemi aperti, una buona amplificazione dello IAC consiste in valori di CT pari a 25-33 (sulla base dei dati pregressi ottenuti in ISS). In caso di mancata fluorescenza relativa al controllo di inibizione, si procede alla ripetizione della reazione diluendo ulteriormente il campione 1:10 o ad una nuova estrazione dell'acido nucleico ove possibile e se il problema persista.

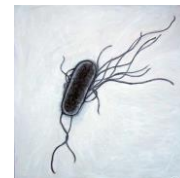
In alcuni casi può capitare che si rilevino positività nelle regioni basse del grafico (oltre i 35 cicli di amplificazione). Nel caso in cui la positività riguardasse una sola delle due repliche, la prova non viene ripetuta e viene considerata positiva per segnali che salgono entro il 35° ciclo di amplificazione mentre i campioni vengono considerati negativi, caso per caso, se il segnale, su una singola replica, sale oltre il 35° ciclo di amplificazione.

La corretta valutazione del risultato è subordinata all'osservazione dell'amplificazione nei controlli positivi e della sua assenza nei controlli negativi.

In caso di assenza di amplificazione nel controllo positivo o di contaminazione dei controlli negativi è necessario ripetere la reazione di amplificazione.

Riferimenti Bibliografici

- Fricker M, Messelhäußer U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M. 2007. Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 73:1892-1898
- Nielsen EM, Andersen MT. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol.* 41:2884-93
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes.* 18:185-92.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol.* 98:1162-1168.



APPENDICE 1

Geni rilevati con la RT-PCR e oligonucleotidi utilizzati

Gene target	Oligonucleotidi Forward, reverse e sonde (5'-3')	Bibliografia
<i>stx1</i>	stx fwd: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG stx rev: CCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Sonda-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>stx2</i>	stx fwd: TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG stx rev: CCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Sonda-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004, 18 :185-192
<i>eae</i>	eae fwd: CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA eae rev: CTCATGCGGAAATAGCCGTTA Sonda-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	Møller Nielsen E. and Thorup Andersen M. J clin Microbiol 2003, 41 :2884-2893
<i>rfbE_{O157}</i> (O157)	O157 fwd: TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA O157 rev: CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT Sonda -AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wbdI_{O111}</i> (O111)	O111 fwd: CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT O111 rev: TTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC Sonda -TTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>wzx_{O26}</i> (O26)	O26 fwd: CGCGACGGCAGAGAAAATT O26 rev: AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACTTT Sonda -CCCGTTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192
<i>ihp1_{O145}</i> (O145)	O145 fwd: CGATAATATTTACCCACCAGTACAG O145 rev: GCCGCCGCAATGCTT Sonda -CCGCCATTCAGAATGCACACAATATCG	Perelle S. et al. Mol Cell Probes 2004 18 :185-192



WZX _{O103} (O103)	O103 fwd: CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT O103 rev:GAAAAAAGCACCCCCGTACTTAT Sonda -CATAGCCTGTTGTTTTAT	Perelle S. et al. J Appl Microbiol 2005 98 :1162–1168
----------------------------	--	--

APPENDICE 2

Esempio di reagenti utilizzati nella RT-PCR per il controllo interno di amplificazione (IAC) per l'amplificazione di una porzione di DNA del plasmide pUC19

Gene target	Oligonucleotidi Forward, reverse e sonda (5'-3')	Bibliografia
IAC	IAC fwd: GCAGCCACTGGTAACAGGAT IAC rev: GCAGAGCGCAGATACCAAAT Sonda -AGAGCGAGGTATGTAGGCGG	Fricker M, et al. Appl Environ Microbiol 73 :1892-1898

APPENDICE 3

Preparazione delle soluzioni di oligonucleotidi e sonde

Gli oligonucleotidi vengono acquistati sotto forma di prodotto di sintesi liofilizzato.

Preparazione soluzioni stock:

Sciogliere gli oligonucleotidi in acqua (DNase/RNase free, comprata pronta all'uso) alla concentrazione di 100 pmoli/μl (μM). Suddividere in aliquote di almeno 100 μl e conservare a -20 °C.

Sciogliere le sonde in acqua (DNase/RNase free, comprata pronta all'uso) alla concentrazione di 50 pmoli/μl (μM). Dispensare in aliquote da almeno 100 μl e conservare a -20 °C.

La soluzione così preparata ha deperibilità pari a due anni, così come le soluzioni di lavoro che ne derivano.

Preparazione soluzioni di lavoro:

Le soluzioni di lavoro vengono preparate in aliquote da 100 μl a partire da una soluzione stock.

Diluire le soluzioni stock 1:5 per ottenere oligonucleotidi con concentrazione di 20 μM e sonde con concentrazione pari a 10 (μM).