

Identificazione, isolamento e conferma degli isolati di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina (STEC) per amplificazione dei geni codificanti i fattori di virulenza mediante PCR convenzionale

Scopo e campo d'applicazione

I ceppi di *E. coli* STEC, patogeni per l'uomo, possiedono geni codificanti la Shiga-tossina (Stx) di tipo I e/o di tipo II e producono la tossina stessa; alcuni ceppi inoltre possiedono anche il gene *eae* che codifica il fattore di adesione intimina, responsabile dell'effetto di "attaching/effacing". (Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 2005 36: 289-311).

Lo scopo di questo protocollo è di accertare mediante amplificazione enzimatica *in vitro* (PCR) la presenza dei geni codificanti le Shiga-tossine (Stx1 e Stx2), tutti i sottotipi ad eccezione del sottotipo *stx2f*, in campioni di prova costituiti da colture di *E. coli*. Inoltre il protocollo include la determinazione della presenza del gene *eae*, considerato di interesse come marcatore degli STEC più associati a patologia umana.

Il presente metodo, viene applicato a colture batteriche miste, a ceppi isolati e a campioni di feci umane per identificare la presenza di STEC. Le differenti tipologie di campioni di prova e i relativi trattamenti sono elencati in dettagli in seguito.

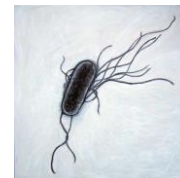
Descrizione

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).

La ricerca dei geni codificanti le Stx, definiti *stx*, viene eseguita utilizzando la metodica dell'amplificazione *in vitro* del DNA (PCR) utilizzando oligonucleotidi specifici per i geni codificanti ciascun tipo di Shiga-tossina (*stx1* e *stx2*), permettendo di discriminare tra essi ma non di identificare con maggior dettaglio il sottotipo di questi (Appendice 1).

Il protocollo si articola in quattro fasi principali successive:

- Preparazione del campione
- Preparazione del DNA stampo da utilizzare per la reazione di PCR
- Allestimento delle reazioni di amplificazione
- Visualizzazione del risultato per elettroforesi orizzontale su gel di agarosio



Preparazione del campione

- Campioni fecali: Il campione viene aperto in asepsi e un'aliquota corrispondente alla quantità prelevata con un'ansa monouso da 10 µl viene seminata ad isolamento direttamente su terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey. Nel caso di campioni clinici da casi di patologia, potenzialmente trattati con antibiotici, una aliquota di campione fecale viene contemporaneamente inoculata in brodo nutriente (TSB) ad una diluizione 1:500-1:1000 volume/volume al fine di consentire la crescita di eventuali STEC presenti ma mantenuti in condizioni di stress. Le piastre e le colture liquide sono poi incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h. Qualora sulla piastra seminata direttamente non si sviluppino colonie con morfologia compatibile con *E. coli* ma si osservi crescita nella coltura liquida, 10 µl di questa vengono seminati su terreno di McConkey agarizzato. Le piastre sono poi incubate a 37 ± 1 °C per ulteriori 18-24 h. Le piastre su cui si ha sviluppo di colonie con morfologia compatibile con *E. coli* vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito.
- Colture batteriche:
Infissioni in agar molle, strisci su piastre o "becchi di clarino": Prelevare il campione in asepsi con un'ansa da 1 µl e seminarlo ad isolamento direttamente su terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey. Incubare le piastre a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le piastre vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte in seguito.
Piastrine di primo isolamento: Questo tipo di matrice è immessa direttamente nel flusso delle operazioni previste di seguito.
- Tamponi di prelievo in terreno di trasporto (feci o colture batteriche): Prelevare il tampone in asepsi e inocularlo in 9 ml di terreno nutriente (TSB) in tubo per batteriologia. L'inoculo è incubato a 37 ± 1 °C per 18-24 h. In seguito all'incubazione, 10 µl del brodo di arricchimento vengono seminati ad isolamento su terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey. Le piastre sono poi incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h. A questo punto le piastre vengono immerse nel flusso delle operazioni descritte di seguito.

Preparazione del DNA stampo per la reazione di PCR:

Le piastre di terreno agarizzato vengono utilizzate nel modo seguente:

- Prelevare, dalla zona di maggior crescita sulla piastra (zona di scarico), la patina batterica con un'ansa monouso da 1 µl. Per ciascun campione, prelevare la patina da tre aree diverse della zona di scarico. Per i ceppi isolati è sufficiente una sola area di scarico.



- Stemperare la patina prelevata in 200 µl di acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti e bollire per 10 minuti. Per ciascun prelievo allestire una reazione di preparazione dello stampo separata e marcata con la dicitura scarico 1; scarico 2; scarico 3.

In caso di positività del campione alla PCR sulla zona di scarico delle piastre, stemperare 5 colonie batteriche isolate separatamente in altrettanti tubi come descritto sopra e sottoporle al saggio PCR. Se non fossero presenti colonie isolate a sufficienza sulla piastra, procedere al re-isolamento dalla zona di scarico su una nuova piastra di terreno di McConkey agarizzato o, in alternativa, il Sorbitol McConkey e ripetere la procedura per la preparazione dello stampo sul numero di colonie stabilito. Qualora non siano riscontrate positività nelle colonie isolate, prelevare altre 5 colonie e ripetere il saggio. Questo passaggio viene ripetuto per un massimo di 15 colonie isolate saggiate in totale.

Per i ceppi isolati positivi alla reazione di PCR vengono saggiate 5 colonie.

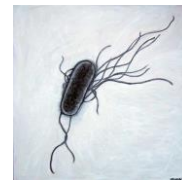
Nel caso in cui i campioni siano stati precedentemente analizzati con il metodo di screening in Real Time PCR e risultati positivi per *stx1* e/o *stx2*, questo metodo viene applicato solo alle summenzionate 15 colonie isolate, e vengono saggiati solo per i geni risultati positivi al metodo di screening in Real Time PCR.

Allestimento delle reazioni di amplificazione

Le reazioni vengono allestite in 50 µl totali per ciascun campione e sono composte da: Tampone di reazione alla concentrazione finale di 1X; MgCl₂ alla concentrazione finale di 1,2 mM, una miscela dei quattro deossiribonucleotidi alla concentrazione finale di 0,2 mM ciascuno; 50 picomoli di ciascun primer, 2 unità di enzima Taq polymerase e 10 µl di DNA stampo. Il volume viene aggiustato a 50 µl con acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti. Le reazioni vengono eseguite come PCR multiplex in grado di identificare simultaneamente la presenza dei tre geni target *stx1*, *stx2* ed *eae*. Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono riportate nell'Appendice 1.

Viene allestita una miscela di reazione unica preparata tenendo conto del numero totale dei campioni da saggiare ma sottraendo il volume del DNA stampo e aggiungendo nell'ordine: Acqua, Tampone di reazione, MgCl₂, la miscela dei quattro deossiribonucleotidi, i primers e infine la Taq polymerase. In alternativa per l'allestimento delle reazioni di PCR si può utilizzare una Mastermix contenente tutti i componenti necessari per la reazione a cui aggiungere solo i primers, il DNA stampo e acqua.

La miscela di reazione deve essere allestita considerando sempre, oltre al numero dei campioni, un controllo positivo costituito da DNA purificato da un ceppo di *E. coli* positivo per i tre geni *stx1*,



stx2 ed *eae*, un controllo negativo costituito da DNA estratto da un ceppo di *E. coli* che non possiede i geni di virulenza target del metodo e un controllo negativo costituito da un campione in cui non è aggiunto alcun DNA stampo. Come controllo positivo può essere utilizzato il ceppo STEC O157 EDL933 (ATCC no 43895) (O'Brien *et al.* 1984; Perna *et al.*, 2001) e come controllo negativo il ceppo di *E. coli* K12 non patogeno MG1655. Ceppi di riferimento sono disponibili presso l'Istituto Superiore di Sanità e possono essere forniti ai laboratori che necessitino di controlli positivi e negativi.

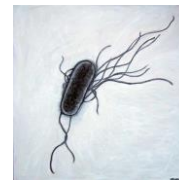
Le reazioni vengono a questo punto incubate in un termociclatore e viene impostato il programma di temperature specifico per i geni da amplificare:

35 cicli di PCR, costituiti ciascuno da 1 min di denaturazione a 95 °C; 2 min per il legame specifico dei primers con il DNA target a 65 °C per i primi 10 cicli, con un incremento graduale della temperatura fino a raggiungere 60 °C nel ciclo 15; e 1.5 min per l'elongazione dei frammenti di amplificazione a 72 °C, con un incremento graduale del tempo tra i cicli 25 e 35 fino a raggiungere i 2.5 min (Paton & Paton, 1998).

Elettroforesi orizzontale su gel di agarosio

Per la visualizzazione dei prodotti di amplificazione, 15 µl della miscela di reazione vengono addizionati di un tampone di caricamento contenente un colorante in ragione di un sesto del volume totale. Questo passaggio non è necessario nel caso le reazioni siano state allestite con una Mastermix che contiene al suo interno, oltre ai reagenti necessari per la PCR, anche il tampone di caricamento. Questo volume di miscela viene quindi caricato su un gel di agarosio al 2 % (peso/volume) in tampone Tris/Borate/EDTA (TBE) o Tris/Acetate/EDTA (TAE) alla concentrazione di 1X e sottoposti ad elettroforesi in campo elettrico costante con voltaggio di 100 V. In un pozzetto del gel viene caricato un marcatore di peso molecolare adatto all'identificazione di bande del peso molecolare degli ampliconi attesi (preferibilmente 100 bp) (Appendice 1).

L'elettroforesi su gel di agarosio permette la visualizzazione del DNA grazie all'utilizzo del bromuro di etidio che si intercala tra le coppie di basi dei frammenti di DNA o in alternativa di un colorante fluorescente alternativo non intercalante in grado di legarsi al DNA a doppia elica che non alteri in maniera significativa il peso molecolare e quindi la migrazione delle molecole di DNA durante l'elettroforesi (es. Midori Green o EuroSafe). Questi coloranti, se eccitati da luce ad una lunghezza d'onda che cade nell'ultravioletto, emettono fluorescenza visibile. Il bromuro di etidio deve essere utilizzato alla concentrazione di 0,5 µg/ml. In alternativa, il gel può essere colorato dopo la corsa elettroforetica in una soluzione acquosa contenente 0,5 µg/ml di bromuro di etidio o la



concentrazione appropriata di colorante alternativo non intercalante. Il risultato viene sul transilluminatore e l'immagine acquisita mediante apparecchiatura fotografica.

Interpretazione dei risultati

I campioni che presentano all'esame visivo delle corse elettroforetiche prodotti di amplificazione delle dimensioni attese per i geni *stx1* e/o *stx2* sono da considerare positivi per la presenza di STEC. Inoltre, tramite l'elettroforesi su gel di agarosio, si determina anche la presenza o assenza della banda di dimensioni compatibili con il gene *eae*.

Il requisito della presenza di analoghe bande nel controllo positivo e di assenza nel controllo negativo è considerato come caratteristica irrinunciabile per la corretta valutazione del risultato e deve pertanto essere sempre soddisfatto.

In caso di assenza delle bande attese nel controllo positivo o di contaminazione del controllo negativo è necessario ripetere la reazione di amplificazione.

Sicurezza e dispositivi di protezione individuale (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 Shiga-tossina sono inseriti nell'allegato XLVI del D. Lgs. 9 Aprile 2008, n. 81 - Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro (aggiornato settembre 2010 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.

Il bromuro di etidio utilizzato per la colorazione dei gel di agarosio è una molecola aromatica ad azione intercalante tra le basi del DNA, pertanto è una sostanza mutagena, inoltre è tossico e deve essere utilizzato nelle condizioni previste dalla scheda di sicurezza allegata al prodotto al momento dell'acquisto. L'utilizzo del transilluminatore a luce ultravioletta può essere dannoso per gli occhi, pertanto è indispensabile utilizzare D.P.I. quali occhiali o schermi in plexiglass.

Bibliografia

- O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science*. 1984; 226: 694-6.



Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare



-
- Perna N.T. *et al.* Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 2001 409: 529-533.
 - Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga *toxigenic Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 598-602.

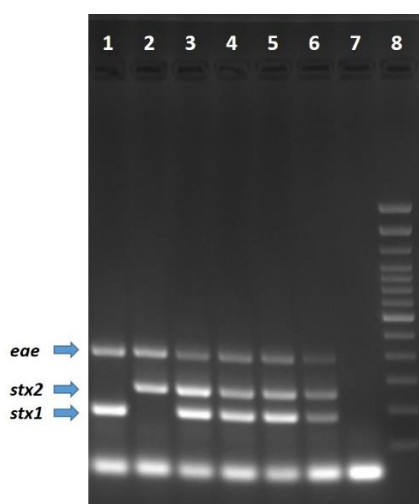


Appendice 1

Tabella: Geni rilevati con la PCR e oligonucleotidi utilizzati

Gene target gene	Nome dell'oligonucleotide (ref.)	Sequenza dell'oligonucleotide	Dimensioni dell'amplicone (bp)
<i>eae</i>	<i>eae</i> AF (Paton & Paton, 1998)	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
	<i>eae</i> AR (Paton & Paton, 1998)	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>stx1</i>	<i>stx1</i> F (Paton & Paton, 1998)	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC	180
	<i>stx1</i> R (Paton & Paton, 1998)	AGAACGCCCACTGAGATCATC	
<i>stx2</i>	<i>stx2</i> F (Paton & Paton, 1998)	GGCACTGTCTGAACTGCTCC	255
	<i>stx2</i> R (Paton & Paton, 1998)	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	

Figura: Esempio di risultati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.



Nell'immagine mostrata i pozzetti numero 6 e 7 contengono rispettivamente i controlli positivo e negativo di amplificazione e il pozzetto numero 8 contiene un marcatore di peso molecolare 100 bp



Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare



(frammenti ogni 100 bp di peso molecolare, compreso tra 1000 bp e 100 bp). Il campione caricato nel pozzetto 1 risulta positivo per *eae* e *stx1*, il campione nel pozzetto 2 è positivo per *eae* e *stx2* e tutti gli altri (3, 4 e 5) per i geni *eae*, *stx1* e *stx2*.