



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

Rev.	In vigore il: RAQ-SP	Redazione RSA-2-BM	Verifica RSA-2-BM sost. RAF-BM	Approvazione DR-SM
00/0	28.02.2024 			

Descrizione delle modifiche:	Prima emissione; Sostituisce ed integra il metodo POME46.
------------------------------	--

Copia controllata n° _____

Copia non controllata



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

INDICE

1.	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	3
2.	RIFERIMENTI	4
3.	ABBREVIAZIONI	5
4.	RESPONSABILITÀ	5
5.	MODALITÀ OPERATIVE	6
6.	REGISTRAZIONI	13
7.	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	13
8.	CONTROLLO DI QUALITÀ	15
9.	RIESAME DELLA VALIDAZIONE	16
10.	ARCHIVIAZIONE E CONSERVAZIONE	16
11.	DESTINATARI	16
	APPENDICE 1	17
	APPENDICE 2	18
	APPENDICE 3	18
	APPENDICE 4	20
	APPENDICE 5	21
	APPENDICE 6	221



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura descrive:

- ✓ La determinazione di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (Stx) (STEC) e la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 in matrici alimentari (ISO TS 13136:2012);
- ✓ L'identificazione di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (Stx) (STEC) di sierotipo O104:H4 in campioni alimentari (EURL-VTEC_Method_04_Rev 2, sviluppato dal Laboratorio Europeo di Riferimento –EURL– per *E. coli*);
- ✓ L'identificazione di *Escherichia coli* produttori di Stx2f in campioni alimentari (EURL-VTEC_Method_10_Rev 0, sviluppato dal Laboratorio Europeo di Riferimento –EURL– per *E. coli*).

Questi diversi metodi possono essere eseguiti tutti e tre, oppure singolarmente, a seconda della necessità e della richiesta del cliente.

Tutte e tre i metodi si compongono di due fasi, una di screening mediante la ricerca in Real Time PCR di geni target nella coltura di arricchimento dell'alimento, in particolare:

- Metodo ISO/TS 13136: geni codificanti le Stx, *stx1* e *stx2*, ed il fattore di adesione *eae* (solo nei campioni positivi per i geni *stx*). In caso di positività a *stx* e *eae* si procede con la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145.
- EURL-VTEC_Method_04: geni codificanti le Stx, *stx1* ed *stx2*, e nei campioni positivi determinazione del sierogruppo O104
- EURL-VTEC_Method_10: gene *stx2f* codificante la Stx2f.

La positività ai geni *stx* o *stx2f* comporta il passaggio nella seconda fase del metodo: l'isolamento del ceppo STEC, mediante semina del terreno di arricchimento su piastra (MacConkey o Sorbitol MacConkey o TBX) e screening di colonie, fino a un totale di 50 colonie. Se nel brodo di arricchimento era stato identificato uno dei 6 sierogruppi O157, O111, O26, O103, O145 e O104, si procede alla conferma del sierogruppo nella colonia STEC isolata, e nel caso di identificazione



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

di O104 si effettua l'analisi per la determinazione della presenza del gene codificante il flagello H4.

La verifica di conformità dei campioni viene effettuata al momento dell'accettazione del conferimento come indicato nella Procedura generale "Gestioni campioni e pratiche" PGCPSP01. Nel caso di campioni refrigerati, la temperatura, rilevata all'interno del contenitore con termometro certificato, deve essere compresa tra + 1.0 °C e + 5.0 °C. Per i campioni congelati, la presenza del ghiaccio secco o siberini congelati nel contenitore, insieme alla verifica dello stato solido del campione, è un'indicazione sufficiente per determinarne la conformità. I campioni di prova spediti a temperatura ambiente non sono sottoposti al controllo della temperatura.

I campioni non conformi per i requisiti sopra citati sono comunque sottoposti ad analisi, nei casi in cui la rilevanza epidemiologica dell'evento a cui sono associati lo richieda.

2. RIFERIMENTI

- POQMSP01 "Controllo di qualità interno".
- POMRBM01 "Gestione materiali di riferimento".
- ISO 11133 "Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media"- ISO 11133:2014/Amd.1:2018
- PGGDSP01 "Gestione della documentazione"
- PGRMSP01 "Redazione metodi di prova"
- PGGASP01 "Gestione delle apparecchiature"
- POMRBM01 "Gestione materiali di riferimento"
- PGVDSP01 "Validazione metodi di prova"
- POQTBM01 "Preparazione, sterilizzazione e controllo di qualità di terreni e dei materiali destinati alla microbiologia"
- EURLVTEC_Method_09_rev 1 del 3/02/2020.



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

3.ABBREVIAZIONI

BM	Biologia Molecolare (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)
DD	Direttore Dipartimento
DR	Direttore di Reparto
EURL <i>E. coli</i>	Laboratorio Europeo di riferimento per <i>Escherichia coli</i>
ME	Metodo di prova esterno
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PTP	Personale tecnico abilitato all'esecuzione delle analisi
RAF	Referente area funzionale
RAQ	Responsabile assicurazione della qualità
RSA-2	Responsabile Settore Analitico LNR/ EURL <i>E. coli</i>
RT-PCR	Real Time PCR
SGQ	Sistema di gestione della qualità
SP	Dipartimento "Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria"; solo nella codifica dei documenti e nella codifica delle funzioni
SM	Reparto Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare – One Health MTA (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)

4.RESPONSABILITÀ

L'esecuzione del presente metodo, la verifica dell'idoneità del campione, la registrazione delle operazioni e dei dati grezzi è responsabilità del PTP. La responsabilità della convalida dei risultati, delle osservazioni e dei calcoli è responsabilità dell'RSA-2-BM e/o del DR- SM.



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

5. MODALITÀ OPERATIVE

Il metodo si compone di fasi sequenziali:

- Arricchimento (fase descritta nei punti 4.2, 5.1, 9.1 e 9.2 del metodo ISO TS 13136:2012 integralmente riportata in appendice 1 alla quale si rimanda). Per quanto riguarda l'arricchimento dell'acqua di irrigazione, si rimanda alla procedura di pretrattamento sviluppata dall'EURL per *E. coli* EURL-VTEC_Method_09_Rev 1, riportata integralmente nell'appendice 2
- Estrazione dell'acido nucleico (appendice 3)
- Identificazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati ai sierogruppi (come descritto negli annessi C ed E del metodo ISO TS 13136:2012, Annesso 1 del metodo EURL-VTEC_Method_04_Rev 2, paragrafo 2 del metodo EURL-VTEC_Method_10_Rev 0 integralmente riportati in appendice 1, appendice 4 e appendice 5 alle quali si rimanda)
- Isolamento dei ceppi STEC nei campioni positivi allo screening (seguendo quanto descritto nel paragrafo 9.5 e annessi C ed F del metodo ISO TS 13136:2012 integralmente riportata in appendice 1 e secondo quanto indicato nel paragrafo 3 della procedura EURL-VTEC_Method_10_Rev 0 riportata in appendice 5 alle quali si rimanda).
- La conferma del sierogruppo nelle colonie STEC dei sei sierogruppi oggetto del metodo e della presenza del flagello H4 viene effettuata mediante RT-PCR.

Il laboratorio è suddiviso in due aree, separate da un divisorio: la prima più interna è adibita alla Microbiologia, mentre la seconda, più esterna, è dedicata alla Biologia molecolare. Le fasi di arricchimento, semina su piastra ed estrazione del DNA, vengono eseguite nell'area del laboratorio adibita per la Microbiologia, dove sono collocate cappa a flusso laminare "Biohazard", frigoriferatore campioni e incubatori. Le altre fasi della procedura, saggi di PCR e RT-PCR, vengono effettuate nell'area di Biologia molecolare dove è collocata una cappa per Biologia Molecolare utilizzata per l'allestimento delle reazioni di PCR.

Di seguito vengono riportate le condizioni di allestimento delle reazioni di RT-PCR



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI DI RT-PCR

Le reazioni per l'identificazione dei geni *vtx1/stx1* e *vtx2/stx2* (ISO TS 13136) vengono condotte in multiplex, unitamente al controllo interno di amplificazione. Per quanto riguarda gli altri target, vengono amplificati uno alla volta, insieme al controllo interno di amplificazione. Le reazioni vengono allestite in 20 µl totali per ciascun campione, analizzato in duplicato, e sono composte come segue:

Mix per campione (Concentrazione iniziale)	Volume (Concentrazione finale)
QuantiFast pathogen Mastermix (Qiagen) 5X	4 µl (1X)
Primer vtx FWD (20 µM)	1 µl (1 µM)
Primer vtx REV (20 µM)	1 µl (1 µM)
vtx1 Probe FAM (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
vtx2 Probe ROX (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
Internal Control Assay MAX 10X	2 µl (1X)
DNA test	2 µl
Internal Control DNA	2 µl
Acqua	7.2 µl
Volume tot.	20 µl



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

Per tutti gli altri target si rimanda a quanto riportato nella tabella sottostante:

Mix per campione (tutti gli altri target):	Volume (Concentrazione finale)
QuantiFast pathogen Mastermix (Qiagen) 5X	4 µl (1X)
Primer FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Primer REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Probe FAM (10 µM) o ROX (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
Internal Control Assay 10X	2 µl (1X)
DNA test	2 µl
Internal Control DNA	2 µl
Acqua	8.6 µl
Voume tot.	20 µl

Nel caso della ricerca dei target *wzx*O104 e *fliC* H4 in colonie STEC isolate (metodo EURL-VTEC04), si può allestire la PCR come multiplex secondo lo schema riportato di seguito:

Mix per campione	Volume (Concentrazione finale)
QuantiFast pathogen Mastermix Qiagen (5X)	4 µl (1X)
Primer <i>wzx</i> O104 FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Primer <i>wzx</i> O104 REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Probe <i>wzx</i> O104 FAM (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
Primer <i>fliC</i> H4 FWD (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Primer <i>fliC</i> H4 REV (20 µM)	0.5 µl (500 nM)
Probe <i>fliC</i> H4 ROX (10 µM)	0.4 µl (200 nM)
Internal Control Assay 10X	2 µl (1X)
DNA test	2 µl
Internal Control DNA	2 µl
Acqua	7.2 µl
Voume tot.	20 µl



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

Viene allestita una miscela di reazione unica preparata tenendo conto del numero totale dei campioni da saggiare e del fatto che devono venire testati in duplicato, sottraendo il volume del DNA stampo. Per preparare la miscela di reazione unica si utilizza il foglio di lavoro dedicato (IOFLBM01.I34n) e si esegue questo calcolo:

- Ogni componente della mix per campione viene moltiplicato per 2.5 (campioni analizzati in duplicato)
- Ogni componente della mix per duplicato, tranne i volumi dei DNA test e Internal Control, 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 Internal Control DNA, 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 6.

Nel corso di ciascuna sessione analitica vengono inoltre aggiunti un controllo positivo (DNA di stipti di riferimento estratti come descritto nell'appendice 3) 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. Accendere lo strumento Rotor-Gene RG-6000 ed inserire il rotore con i tubi di reazione. Lanciare il programma Rotor-Gene 6000 Series e creare una nuova analisi. Specificare il tipo di rotore utilizzato (36 o 72 microtubi) e inserire 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.



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

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 nei seguenti canali:

- RT-PCR *vtx1/vtx2*: verde (FAM target *vtx1/stx1*), arancione (ROX target *vtx2/stx2*) e giallo (MAX internal control)
- RT-PCR per tutti gli altri target escluso *fliC* H4: verde (FAM target) e giallo (MAX internal control)
- RT-PCR per *fliC* H4: orange (ROX target) e giallo (MAX internal control)

ed avviare la RT-PCR.

Scegliere la cartella di destinazione del file (cartella RT-PCR ZA sul desktop).

Nominare i campioni in esame e inserire per ognuno il tipo di campione (colonna "Type"). In particolare, per i campioni di DNA test inserire come tipo "Unknown", per il campione positivo inserire "Positive Control" e per il negativo "No Template Control (NTC)". Dare_l'OK e attendere che la RT-PCR sia terminata per registrare i risultati.

Al termine dei cicli di amplificazione i dati relativi all'analisi vengono automaticamente raccolti nella cartella RT-PCR ZA sul desktop, identificata con la data, l'identificativo del campione, il gene target. In allineamento con quanto previsto nella procedura "Registrazioni della qualità" (PGRQSP01) per la protezione ed integrità dei dati conservati su supporti informatici, dopo ogni analisi, il file relativo viene esportato su un disco esterno USB e salvato in una cartella creata appositamente sullo spazio remoto dedicato al dipartimento. Hanno accesso a tale cartella il RSA-2-BM, il suo sostituto e i PTP, che hanno la responsabilità del trasferimento dei dati nello spazio remoto del dipartimento.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

- Fase di isolamento: PCR convenzionale

I prodotti di amplificazione ottenuti nella fase di isolamento vengono visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Ad ogni sessione analitica di PCR vengono inclusi anche il DNA stampo ottenuto da ceppo positivo per i target *vtx1/stx1*, *vtx2/stx2* ed *eae* (ISO TS 13136:2012), ed *stx2f* (procedura EURL-VTEC_Method_10_Rev 0) i cui prodotti di amplificazione vengono visualizzati unitamente a quelli dei campioni in esame. Viene inoltre aggiunto un marcatore di peso molecolare, cui fare riferimento per la stima delle dimensioni delle bande ottenute. La valutazione del risultato è legata alla osservazione dell'amplificazione nei controlli positivi e della sua assenza nei controlli negativi. In caso di assenza di amplificazione nel controllo positivo o presenza di contaminazione nei controlli negativi è necessario ripetere la reazione di amplificazione. Un campione è positivo se si osservano prodotti di amplificazione di dimensioni compatibili con il prodotto atteso, così come valutato per confronto con i prodotti ottenuti con il controllo positivo e con le bande del marcatore di peso molecolare.

Per l'allestimento delle razioni di PCR convenzionale procedere come quanto riportato di seguito:

Maternix per campione PCR triplex *stx1/stx2/eae* (ISO TS 13136)

Reagente (concentrazione iniziale)	Volume (concentrazione finale)
MyTaq Red Mix (2X)	25 µl
<i>stx1</i> fwd (50 µM)	1 µl
<i>stx1</i> rev (50 µM)	1 µl
<i>stx2</i> fwd (50 µM)	1 µl
<i>stx2</i> rev (50 µM)	1 µl
<i>eae</i> fwd (50 µM)	1 µl
<i>eae</i> rev (50 µM)	1 µl
H ₂ O	9 µl
DNA stampo	10 µl
Volume totale	50 µl



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

Condizioni di amplificazione:

95°C 15 min

35 cicli: 1 min a 95 °C; 2 min a 65 °C per i primi 10 cicli, diminuendo di un grado a ciclo fino ad arrivare a 60 °C al ciclo 15; aumentare il tempo di allungamento fino ad arrivare a 2.5 min dal ciclo 25 al 35.

Lunghezza dei frammenti di amplificazione: eae 384 bp; stx2 255 bp; stx1 180 bp.

Mastermix per campione PCR *stx2f* (EURL-VTEC_Method_10)

Reagente (concentrazione iniziale)	Volume (concentrazione finale)
MyTaq Red Mix (2X)	25 µl
stx2f-F1 (50 µM)	1 µl
stx2f-R1 (50 µM)	1 µl
H ₂ O	µl
DNA stampo	10 µl
Volume totale	50 µl

Preparare la mastermix totale per il numero di campioni +1. Aliquotare 40 µl nelle provette e aggiungere DNA stampo.

Le condizioni di amplificazione sono:

95 °C per 15 min,

35 cicli 94 °C per 50 sec, 64 °C per 40 sec e 72 °C per 60 sec,

72 °C per 3 min.

Lunghezza del frammento di amplificazione: 419 bp.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

6. REGISTRAZIONI

Le registrazioni relative alle fasi del metodo vengono registrate sui fogli di lavoro IOFLBM01.I34n, IOFLBM01.I35n, IOFLBM01.I41n e IOFLBM01.I42n.

7. INTERPRETAZIONE ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Interpretazione dei risultati della Real Time PCR

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, che nel caso della RT-PCR effettuata con Rotorgene RG-6000, una buona amplificazione dello IAC consiste in valori di CT pari a 25-33 (sulla base dei dati pregressi e di quanto riportato nelle indicazioni del produttore della Mastermix contenente lo IAC). 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), soprattutto nella fase di screening. Nel caso si rilevassero tali positività tardive il risultato viene valutato caso per caso. 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.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

- **Interpretazione dei risultati della PCR convenzionale**

I campioni che presentano all'esame visivo delle corse elettroforetiche prodotti di amplificazione delle dimensioni attese sono da considerare positivi per la presenza di VTEC.

Il requisito della presenza di analoghe bande nei controlli positivi e di assenza nei controlli negativi 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 dei controlli negativi è necessario ripetere la reazione di amplificazione.

- **Espressione dei risultati**

I metodi ISO TS 13136:2012, EURL-VTEC_Method_04, e EURL-VTEC_Method_10, possono essere eseguiti insieme, oppure singolarmente, a seconda della necessità e della richiesta del cliente. Tale informazione deve essere fornita al cliente e a tal fine nel Rapporto di Prova è necessario indicare quale dei metodi sia stato eseguito.

Per l'espressione dei risultati del metodo ISO TS 13136:2012, si rimanda a quanto indicato nel metodo ISO stesso.

Nel caso di identificazione del sierotipo O104:H4 nel ceppo STEC isolato, mediante l'applicazione dell'EURL-VTEC_Method_04, nel rapporto di prova si indica: "Presenza di STEC O104:H4".

Nel caso di positività/negatività al target relativo al gene *stx2f* mediante il metodo EURL-VTEC_Method_10, il risultato viene espresso come "Presenza/Assenza di *Escherichia coli* produttore di Stx2f", o nel caso l'isolamento del ceppo non abbia successo, come "Identificazione presuntiva di *Escherichia coli* produttore di Stx2f".



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

8. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ad ogni seduta di Real Time PCR condotta con il Rotorgene RG6000 viene aggiunto un controllo positivo costituito dal DNA estratto da un ceppo di *E. coli* positivo e un controllo costituito da miscela di reazione con aggiunta di acqua.

Ad ogni sessione analitica di PCR convenzionale per l'isolamento del ceppo STEC si aggiunge un controllo positivo costituito dal DNA estratto da un ceppo di *E. coli* positivo per *stx1*, *stx2* ed *eae* (fase di isolamento ISO TS 13136), o *stx2f* (fase di isolamento EURL-VTEC_Method_10_Rev 0) e un controllo negativo costituito da miscela di reazione con aggiunta di acqua.

I ceppi utilizzati come controlli positivo e negativo sono inclusi nella lista dei materiali di riferimento gestiti secondo la POMRBM01.

I risultati relativi ai controlli sono riportati nella Carta di controllo di qualità interno per i metodi qualitativi (POQMSP01.11n), al fine di determinare il trend dei risultati del laboratorio ed intraprendere, se necessario, azioni preventive per consentire il miglioramento delle performances. Le carte di controllo riportano i risultati dei controlli in ordinata e in ascissa il riferimento o la data di applicazione del metodo, indicandoli come segue: +1 quelli corretti (sia per il controllo positivo che per quello negativo) e -1 quelli errati (nel caso in cui uno o entrambi i controlli non abbiano dato il risultato atteso).

Nel caso in cui l'arricchimento preveda l'utilizzo di terreni con supplemento o da ricostituire si effettua il controllo di qualità come segue:

Con 2 ml del terreno preparato per l'arricchimento viene allestita una brodocoltura utilizzando il ceppo di riferimento O157:H7 C210-03 che non fermenta il sorbitolo. Verificare l'intorbidamento della brodo coltura dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 18-24 ore. Il controllo della specificità della crescita viene eseguita seminando la brodocoltura su terreno solido SMAC con lettura delle piastre dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 18-24 ore. Tutte le colonie devono mostrare il tipico aspetto incolore mentre eventuali colonie contaminanti possono essere riconosciute dal colore rosso.

Per la preparazione dei terreni e dei reagenti si rimanda all'appendice 6.



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

9. RIESAME DELLA VALIDAZIONE

Annualmente il laboratorio procede ad un riesame della validazione del metodo di prova, secondo quanto prescritto dalla procedura generale "Validazione metodi di prova" PGVDSP01. Ove possibile nel riesame sono tenuti in considerazione i risultati di sensibilità e specificità relativi agli ultimi 5 anni. A tale scopo possono essere utilizzati i dati ottenuti, ad ogni sessione analitica, sui controlli positivi e/o sui campioni dei proficiency test. I parametri delle prestazioni del metodo, per i quali verificare il soddisfacimento dei requisiti, sono rappresentati da sensibilità, specificità e accuratezza. In caso di scostamento dei valori relativi ai parametri di prestazione del metodo ottenuti in sede di riesame rispetto ai requisiti specificati nei piani di validazione, la validazione deve essere ripetuta.

L'esito del riesame della validazione viene registrato utilizzando il modulo "Dichiarazione di idoneità" PGVDSP01.

10. ARCHIVIAZIONE E CONSERVAZIONE

La copia originale della presente procedura è conservata presso l'archivio SGQ dipartimentale gestito del RAQ-SP

11. DESTINATARI

La procedura è distribuita in forma controllata alle seguenti funzioni: DD-SP, RAQ-SP, RAF-BM, RVD-2-BM, DR-SM, RSA-2-BM e a tutto il personale tecnico abilitato all'esecuzione di tale attività di prova.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

APPENDICE 1

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



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

APPENDICE 2

Laboratory procedure for testing spent irrigation water for the presence of STEC (EURL-VTEC Method 09 Rev 1)



**DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA**

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

APPENDICE 3

Preparazione del DNA per la fase di screening in Real Time PCR:

Prelevare 1 ml dalla brodocoltura di arricchimento e procedere all'estrazione del DNA alternativamente con Instagene Matrix Bio-Rad o qualunque altro prodotto commerciale basato sulla stessa tecnologia (resina non-immobilizzata) secondo il protocollo descritto dal produttore. Il DNA così preparato viene utilizzato come stampo per le successive analisi di RT-PCR. L'acido nucleico viene sempre diluito 1:10 prima dell'utilizzo.

Preparazione del DNA per la fase di isolamento:

Preparazione pool da 10 colonie ciascuno: prelevare con un'ansa monouso da 1 µl parte della colonia da saggiare, farne una semina su TSA e stemperarla in 300 µl di acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti. Proseguire fino ad inoculare 10 colonie. Bollire per 10 minuti.

Preparazione di DNA da singola colonia: prelevare con un'ansa monouso da 1 µl parte della colonia da saggiare, farne una semina su TSA se necessario e stemperarla in 100 µl di acqua deionizzata sterile priva di nucleasi contaminanti. Bollire per 10 minuti. Nel caso del saggio di colonie singole per i target wzx O104 e fliC H4 tramite Real Time PCR, preparare il DNA da singola colonia stemperandola in 1 ml di acqua deionizzata sterile procedendo con la purificazione mediante Instagene Matrix Bio-Rad come indicato nel protocollo fornito dal produttore.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	--	--------

APPENDICE 4

Detection and identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 in food by Real Time PCR (EURL-VTEC Method 04 Rev 2)



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

APPENDICE 5

Detection of *Escherichia coli* producing the Stx2f subtype by Real-Time PCR (EURL-VTEC Method 10 Rev 0)



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000

Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi *E. coli* produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4

REV. 0

APPENDICE 6

PREPARAZIONE DEI TERRENI

Modified Tryptone Soy Broth (mTSB)

- Aggiungere 1,5 g di sali biliari n. 3 ad 1 l di TSB sterile.
- Sterilizzare mediante filtrazione su membrana.

In alternativa:

Sciogliere i sali biliari n. 3 in TSB in quantità tali da ottenere una concentrazione pari a 15 g/l (esempio: 1,5 g in 100 ml di TSB). Sterilizzare mediante autoclave. Diluire 1:10 in TSB sterile per ottenere la concentrazione di utilizzo finale pari a 1.5 g/l.

Soluzione di Novobiocina (da preparare il giorno di utilizzo)

- Sciogliere 10 mg di Novobiocina in 2 ml di acqua (concentrazione finale 5 mg/ml).
- Sterilizzare mediante filtrazione su membrana.

Soluzione di Acriflavina (da preparare il giorno di utilizzo)

- Sciogliere 0,12 g di acriflavina in 10 ml di acqua.
- Sterilizzare mediante filtrazione su membrana.

Preparazione del terreno completo

Aggiungere 1,6 ml di soluzione di Novobiocina preparata come sopra descritto o 0.5 ml di soluzione di Acriflavina a 500 ml di mTSB subito prima di utilizzarlo.

La concentrazione finale della Novobiocina è 16 mg/l mentre quella dell'acriflavina è 12 mg/l.

Acqua Peptonata (se non acquistata pronta all'uso)

- Sciogliere 20 g di terreno disidratato in 1 l di acqua distillata.
- Sterilizzare mediante autoclave per 15 minuti a 121 °C.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC53.000	Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga tossina (STEC), inclusi <i>E. coli</i> produttori di Stx2f e per la determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145 e del sierotipo O104:H4	REV. 0
---------------	---	--------

PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI OLIGONUCLEOTIDI E SONDE

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

Per quanto riguarda i primers per la PCR convenzionale (PCR triplex *eae stx1 stx2* fase di isolamento del metodo ISO/TS 13136 e PCR per *stx2f* EURL-VTEC_Method_10_Rev 0) i primers vengono risospesi a una concentrazione di 50 μM e vengono preparate aliquote da almeno 100 μl conservate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparazione soluzioni stock dei reagenti per Real Time PCR:

Sciogliere gli oligonucleotidi in acqua (DNase/RNase free, comprata pronta all'uso) alla concentrazione di 100 μM . Suddividere in aliquote 100 μl e conservare a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oppure diluire direttamente alle soluzioni di lavoro.

Sciogliere le sonde in acqua (DNase/RNase free, acquistata pronta all'uso) alla concentrazione di 50 μM . Dispensare in aliquote di almeno 100 μl e conservare a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 di almeno 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).

