



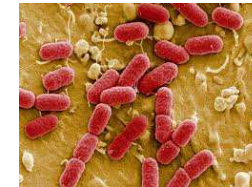
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

DIAGNOSTICA MOLECOLARE APPLICATA ALLA SICUREZZA ALIMENTARE:

ISO/TS 13136:2012 Microbiology of food and animal feed – real-time polymerase chain reaction (PCR) – based method for detection of food-borne pathogens – Horizontal method for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups

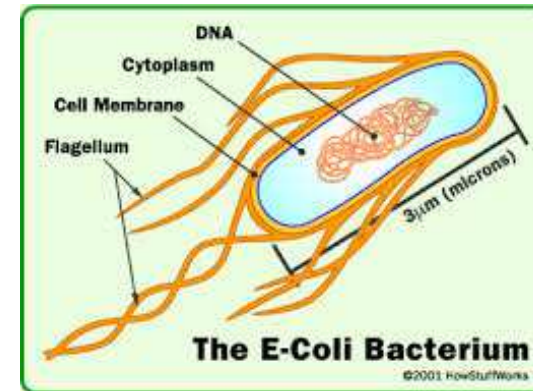


Escherichia coli



(Fonte: www.galileonet.it)

- ✓ Batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*
- ✓ In base al comportamento assunto all'interno dell'organismo ospite, viene classificato in 5 diverse tipologie:
 - ✓ *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC)
 - ✓ *Escherichia coli* enteroaggregativi (EAEC)
 - ✓ *Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC)
 - ✓ *Escherichia coli* enteropatogeno (EPEC)
 - ✓ *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC)
- ✓ I ceppi produttori di tossina *shiga-like* o verocitotossina (tossina dotata di attività citotossica sulle colture cellulari VERO), detti anche STEC o VTEC, causano tossinfezioni alimentari per il consumo di alimenti contaminati o per contattato diretto con animali (specialmente i bovini) portatori asintomatici di questi batteri, che costituiscono il loro *reservoir* naturale.



ISO TS 13136:2012

La ISO TS 13136:2012 descrive l'identificazione di STEC mediante la rilevazione di i seguenti geni :

- i maggiori geni di virulenza di coli STEC sono STX (1 e 2) e eae
- i geni associati ai sierogruppi O:157, O:111, O:26, O:103, O:145

In ogni caso, quando vengono rilevati uno o entrambi i geni STX, si prova con l'isolamento del ceppo

L'isolamento degli STEC da campioni positivi per la presenza dei geni può essere approfondito con la specificazione dei sierogruppi, come campo di applicazione del metodo, attraverso l'impiego di terreni di arricchimento specifici per ciascun sierogruppo





Il metodo specificato dalla ISO TS 13136:2012 prevede i seguenti steps:

- a) Arricchimento microbiologico
- b) Estrazione degli acidi nucleici
- c) Rilevazione dei geni di virulenza
- d) Rilevazione dei geni associati ai sierogruppi
- e) Isolamento delle colonie dai campioni positivi e conseguente ricerca dei geni risultati positivi nella coltura di arricchimento



Metodi di arricchimento

L'incubazione dell'alimento avviene in un terreno liquido di arricchimento non selettivo, per incrementare il numero di E. coli STEC, scelto tra:

- mTSB+N (modified Tryptic Soy Broth contenente 1,5 g/l di sali biliari e 6 mg/l di Novobiocina)
- mTSB+A (modified Tryptic Soy Broth contenente 1,5 g/l di sali biliari e 12 mg/l di acriflavina). Tale terreno è indicato per il latte ed i prodotti da esso derivati

L'mTSB+N e l'mTSB+A sono utilizzati in caso di alimenti per i quali si sospetta un'abbondante microflora contaminante

La presenza di STEC nelle carni di bovini e suini è correlata alla presenza di batteri patogeni nel fieno e nei mangimi. La presenza di STEC nelle carni di bovini e suini è correlata alla presenza di batteri patogeni nel fieno e nei mangimi.



Prelievo

Si prelevano 25 g o 25 ml di campione se liquido, e si aggiungono 225 ml del terreno di arricchimento scelto.

Per i **semi per la produzione di germogli** si pesano 50 g e si aggiungono 450 ml di terreno di arricchimento

E' preferibile usare sacchetti per Stomacher muniti di dispositivo filtrante per ridurre le interferenze delle particelle di campione con i componenti per l'immunocattura

Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore



Metodi di estrazione e purificazione del DNA (da colture batteriche in terreno solido o liquido)

Da brodo di arricchimento

- ❖ Particelle immunomagnetiche anti-*E. coli* O:157, O:111, O:26, O:103 e O:145
- ❖ MagCore Genomic DNA Bacterial Kit o kit simili basati sulla tecnologia di BOOM (biglie magnetiche)
- ❖ Chelex ®100 o InstaGene (BIORAD)



Metodi di estrazione e purificazione del DNA (da colture batteriche in terreno solido o liquido)

Da brodo di arricchimento mediante Chelex ®100 o InstaGene

- - Centrifugare 1 ml brodocoltura a 10000 rpm X 2 min
- - Togliere il surnatante e aggiungere 200 µl Chelex ®100 o InstaGene e risospendere
- - Bollire a 56°C per 15-30 min
- - Bollire a 100°C per 8 min
- - Centrifugare a 10000 rpm X 2 min
- - Raffreddare in ghiaccio per 5 min
- - Recuperare il surnatante (DNA)



Metodi di estrazione e purificazione del DNA (da colture batteriche in terreno solido o liquido)

Da colonie isolate (TBX, McConkey, Agar Nutrient o TSA) mediante
trattamento termico

- Sospendere una colonia in 100 ml di acqua DNAsi-RNAsi free sterile
 - Bollire per 10 minuti a 100°C
- Centrifugare 8000 g per 5 min
- Prelevare il surnatante (DNA) e utilizzarlo come campione



Tecniche di analisi

La presente ISO prevede l'utilizzo delle tecniche PCR real time e end point per la rilevazione dei maggiori geni di virulenza di coli STEC sono STX (1 e 2) e eae dei geni associati ai sierogruppi O:157, O:111, O:26, O:103, O:145

Polymerase Chain Reaction: principio Amplificazione selettiva in vitro di una sequenza di DNA target

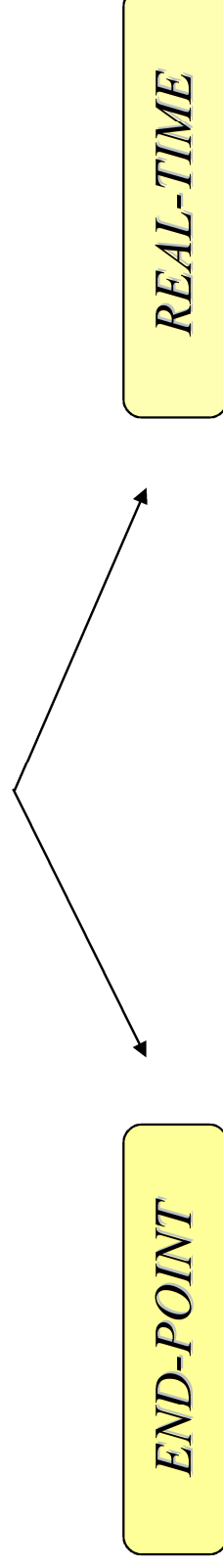


Polimerase Chain Reaction

[Mullis *et al.*, 1986; Mullis e Faloona, 1987]

Amplificazione esponenziale *in vitro* di regioni specifiche degli acidi nucleici.

Per poter applicare questa tecnica è necessario conoscere la sequenza delle regioni terminali della sequenza bersaglio; la loro conoscenza permette la sintesi dei due inneschi oligonucleotidici ("primer") necessari per la reazione



**Rilevazione
prodotto PCR su
gel di agarosio
dopo
l'amplificazione**

**Analisi in tempo
reale del prodotto
PCR**



Polimerase Chain Reaction

La reazione necessita dei seguenti reagenti:

- MgCl_2 (cofattore dell'enzima DNA polimerasi)
- dNTPs (miscela equimolare di dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- Buffer (sol.contenente tampone e Sali)
- Primer (in genere due) sono oligonucleotidi di 15-20 bp complementari alle estremità dello stampo e costituiscono la parte essenziale della tecnica
- Taq DNA polimerasi (o altro enzima analogo) catalizza la reazione di polimerizzazione del filamento del DNA
- H_2O per volume



PCR End Point

La PCR end-point non è un metodo quantitativo ma qualitativo

Alla fine della reazione non sempre la quantità di DNA del campione d'origine è proporzionale all'intensità della banda ottenuta

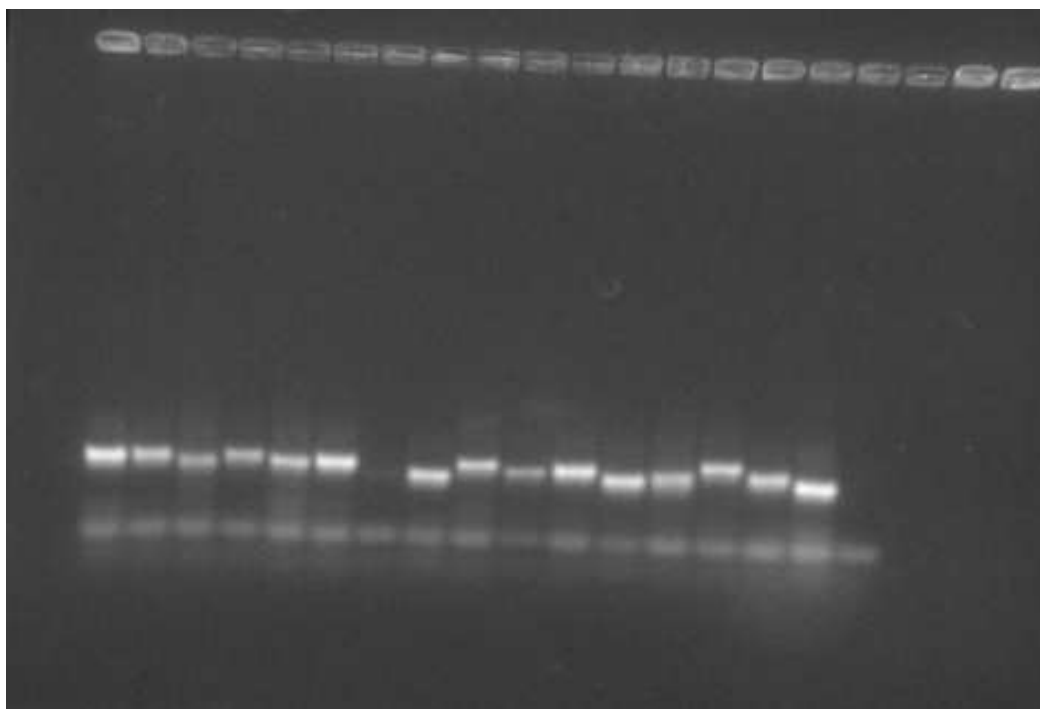
Il campione si sottopone al numero di cicli stabiliti (30-40), alla fine della reazione un'aliquota si sottopone ad elettroforesi su gel di agarosio 2% per verificare:

- la lunghezza dell'amplificato (controllo del peso molecolare in bp mediante ladder)
- L'assenza di frammenti aspecifici
- La quantità di amplificato ottenuto (proporzionale all'intensità della banda)



PCR End Point

2 gr Agarosio in 100 ml di tris/borate/edta (TBE) o tris/acetate/EDTA (TAE)



Real-Time PCR

Il termine PCR real-time si riferisce ad una “reazione PCR in cui la concentrazione dell’ amplicone è misurata in tempo reale nel tubo di reazione mentre l’amplificazione è ancora in corso

L’uso di questa tecnica consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA target

AMPLIFICAZIONE: Prevede essenzialmente gli step di una classica PCR

QUANTIFICAZIONE: Effettuata aggiungendo composti la cui fluorescenza emessa ad ogni ciclo di reazione è proporzionale alla quantità di amplificato.



Real-Time PCR

La rt-PCR prevede l'uso di *Sonde* (o *probe*) fluorescenti che fungono da indicatori diretti del numero di ampliconi sintetizzati durante la PCR

In una reazione di real-time PCR, la fluorescenza aumenta in proporzione all'accumulo dei prodotti di PCR

La fluorescenza, durante ogni ciclo di amplificazione, può essere rilevata utilizzando uno strumento quantitativo che segue la cinetica della reazione di PCR



Rt-PCR: componenti della la reazione

1. DNA target
2. Reattivi di una classiaca PCR
3. Sonda (**fluorocromo**)

Sonda (o probe): sequenza di DNA a singola elica che riconosce la sequenza ad essa complementare presente all'interno dell'area genomica delimitata dai due oligonucleotidi primer, alla quale si lega specificamente. Tale legame, o ibridazione, determina la produzione di un segnale che aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità di amplicone generato durante la reazione di PCR real-time





Isolamento colonie da campioni positivi

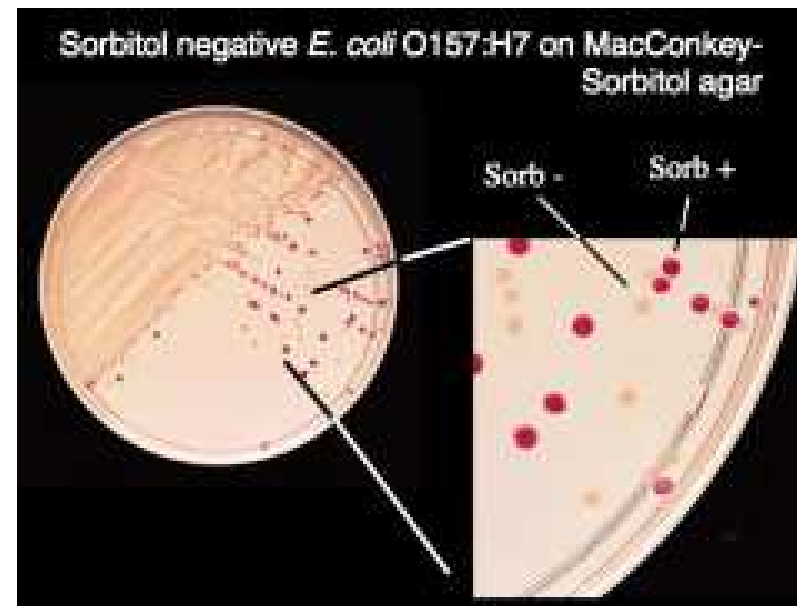
In caso di positività di uno dei geni associata ai sierogruppi si deve procedere all'isolamento delle colonie dalla coltura di arricchimento su terreni di coltura specifici per i sierogruppi

Il terreno usato deve poter facilitare l'identificazione e la selezione delle colonie nelle quali sono presenti i geni *stx* e *eae*

LA ISO TS 13136:2012 prevede l'utilizzo del **TBX** più altro appropriato terreno (**SMAC** e/o **RMAC**)



SMAC: Per i campioni O:157 positivi: utilizzare il **Sorbitol McConkey agar (SMAC)** senza antibiotici che differisce dal MacConkey Agar perché ha come carboidrato fermentabile il sorbitolo al posto del lattosio. La selettività del terreno è incrementata dalla cefixime e dal potassio tellurito che inibiscono la crescita di alcuni generi batterici **Non Fermentanti il Sorbitolo**



Le colonie da prendere in considerazione sono quelle sorbitolo negative



Il **TBX** è un terreno selettivo-cromogenico e contiene il BCIG (acido 5-Bromo -4-cloro-3-indolil- β -D glucuronico). Gran parte dei ceppi di *Escherichia coli* possiedono una β -D-glucuronidasi che scinde il BCIG; questa reazione colora di blu. Alcuni ceppi di *Escherichia coli* non possiedono la β -D-glucuronidasi, in particolare il sierotipo enteremorragico O:157:H7, che su TBXAgar forma colonie bianche.

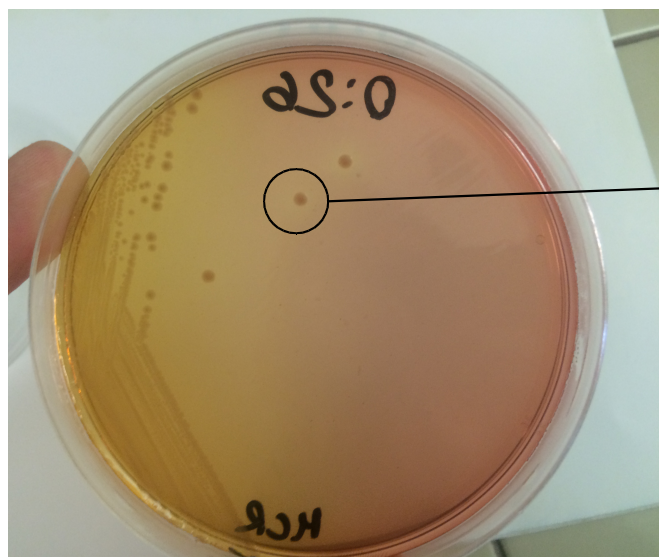


Pos: colonie STEC positive

Neg: colonie stec negative o
sierogruppo O:157



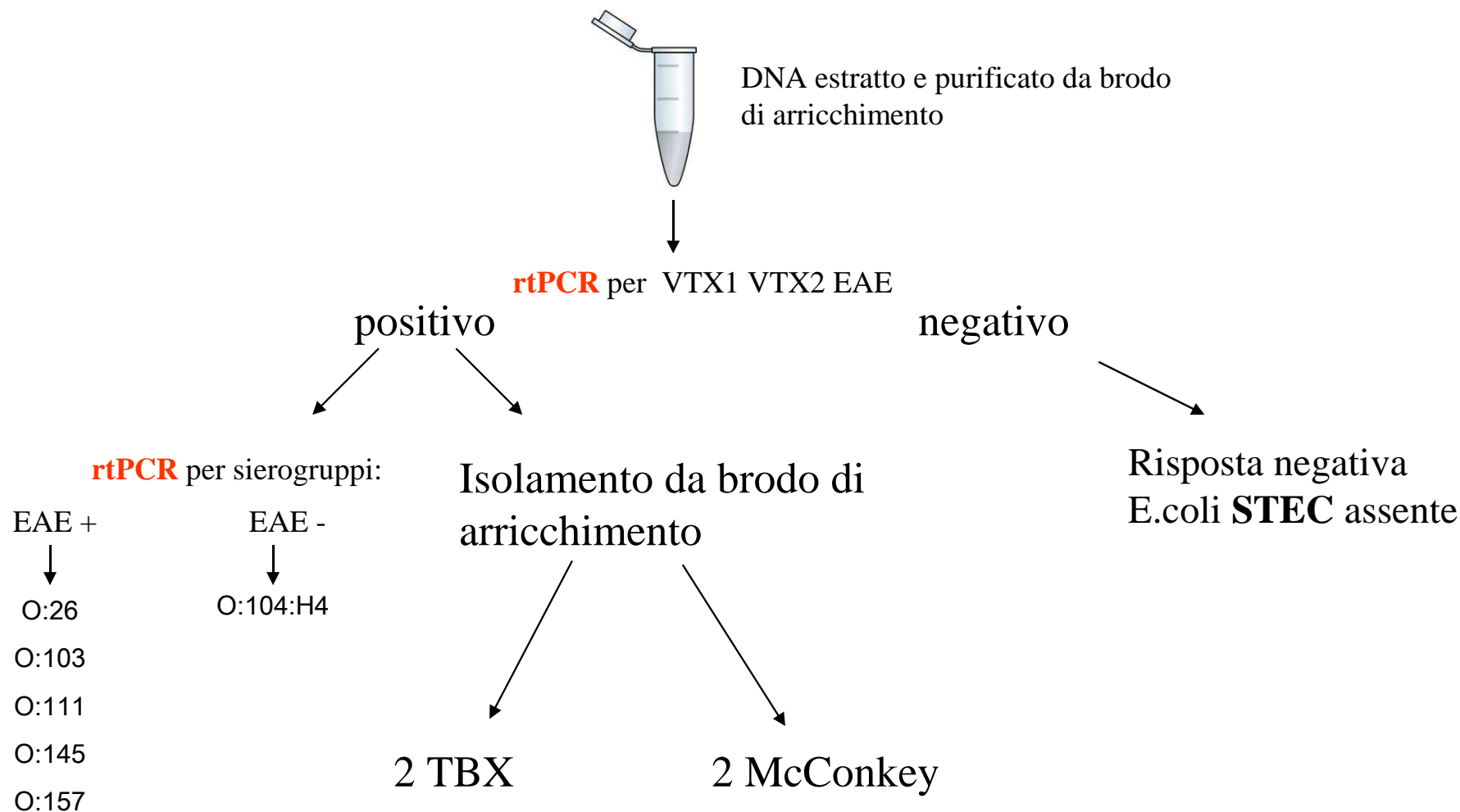
Per i campioni in cui è stata riscontrata la presenza del sierogruppo O26 si utilizza per l'isolamento il **Rhamnose McConkey agar (RMAC)** terreno che contiene, al posto del lattosio, il ramnosio non utilizzato dai coli appartenenti a questo sierogruppo e quindi distinguibili da altri E.coli che lo fermentano

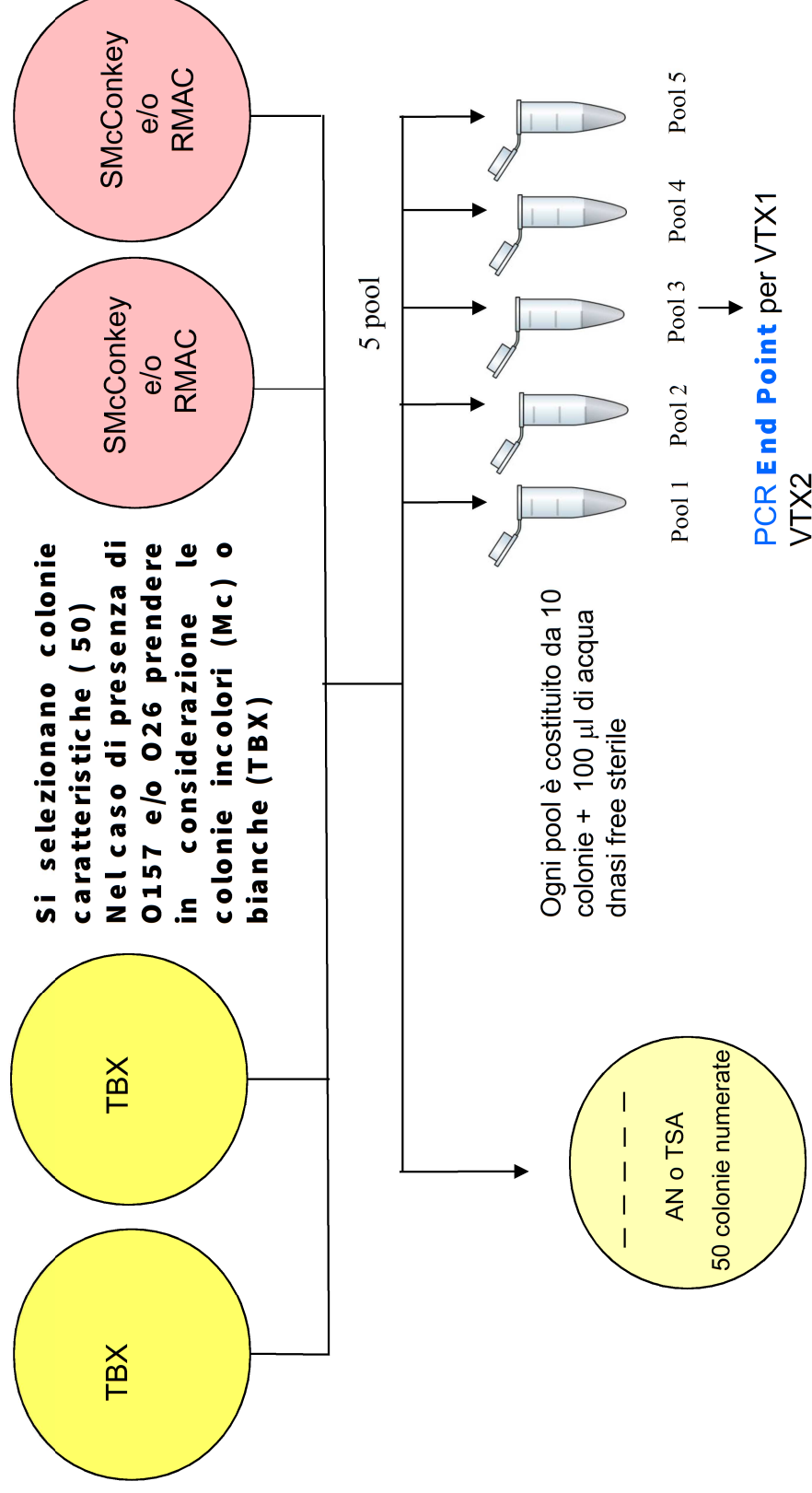


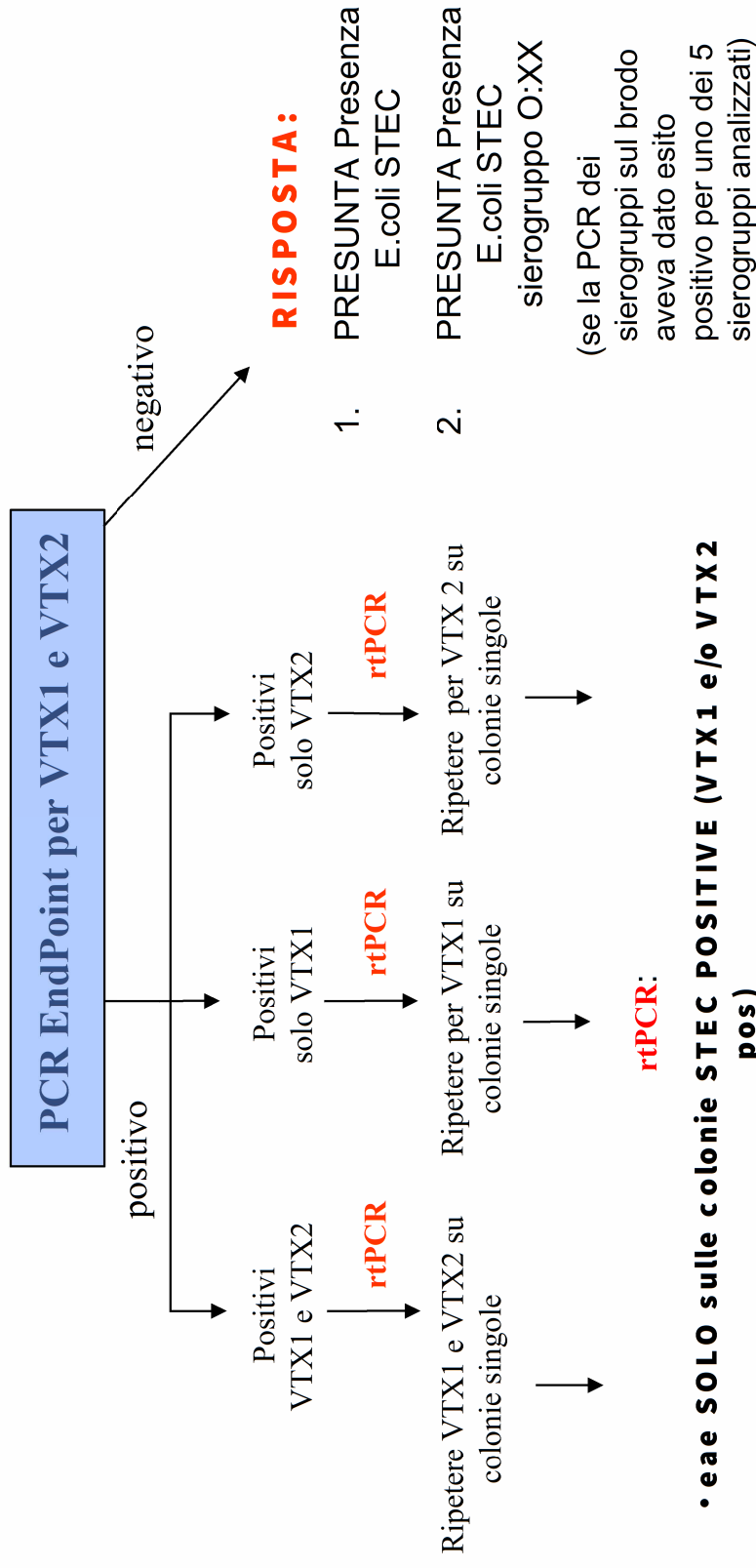
Sierogruppo O:26 RHA
negativo



Ricerca coli VTEC

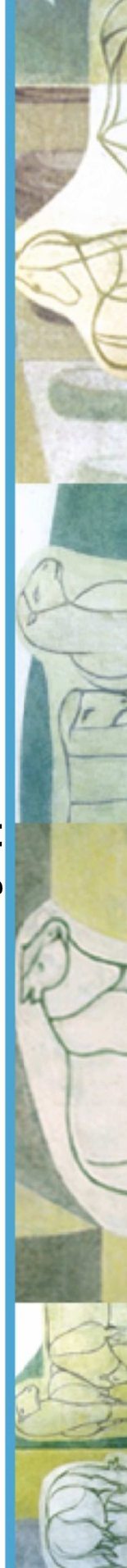




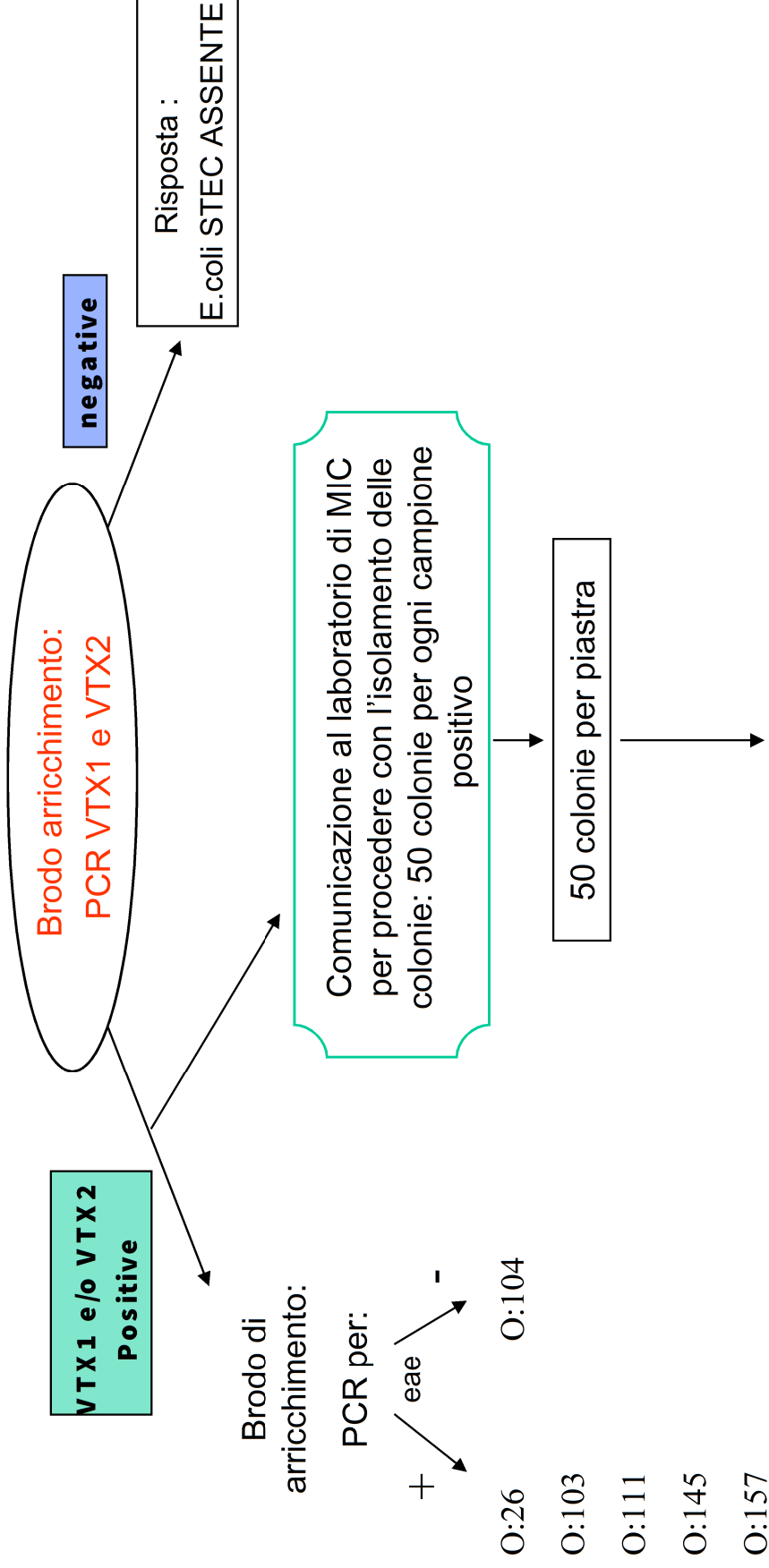


RISPOSTA:

1. Presenza E.coli STEC (se le PCR dei sierogruppi è negativa)
2. Presenza E.coli STEC sierogruppo O:XX



Flusso analisi E.coli STEC LTV



PCR per VTX1 e VTX2 su 5 pool di 10 colonie ognuno

Positivi VTX1 e VTX2

Positivi solo VTX1

Positivi solo VTX2

Ripetere PCR per
VTX1 e VTX2
sulle colonie
singole

Ripetere PCR
per VTX1 sulle
colonie singole

Ripetere PCR
per VTX2 sulle
colonie singole

PCR:

- eae SOLO sulle colonie STEC POSITIVE (VTX1 e/o VTX2 pos)
- SOLO sierogruppo/i eventualmente positivo/i nel brodo

RISPOSTA:

1. Presenza E.coli STEC (se le PCR dei sierogruppi è negativa)
2. Presenza E.coli STEC sierogruppo O:XX

RISPOSTA:

1. PRESUNTA Presenza E.coli STEC
2. PRESUNTA Presenza E.coli STEC sierogruppo O:XX

(se la PCR dei sierogruppi sul brodo aveva dato esito positivo per uno dei 5 sierogruppi analizzati)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

L'APPRENDERE MOLTE COSE NON INSEGNA L'INTELLIGENZA (ERACLITO)

