

Procedura operativa per la ricerca dei geni codificanti le tossine botuliniche

Sarah Lovari

Botulismo umano e animale. Diagnosi di laboratorio

29 novembre 2016




Il metodo prevede

- La semina del campione da analizzare in idonei terreni di coltura di arricchimento, al fine di incrementare il numero di cellule di clostridi produttori di tossine botuliniche.
- L'estrazione degli acidi nucleici dalle colture di arricchimento, mediante lisi delle cellule batteriche.
- L'amplificazione degli acidi nucleici estratti mediante determinazione simultanea dei geni che codificano per le tossine botuliniche.

DIREZIONE OPERATIVA CONTROLLO DEGLI ALIMENTI
POS MIC 012 INT rev. 3 del 09/06/2014
TOSSINE BOTULINICHE TIPO A, B, C, D, E, F (PCR MULTIPLEX)

pag. 1 di 15


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana

**TOSSINE BOTULINICHE TIPO A, B, C, D, E, F
(PCR MULTIPLEX)**

Redatto:
P. DE SANTIS 

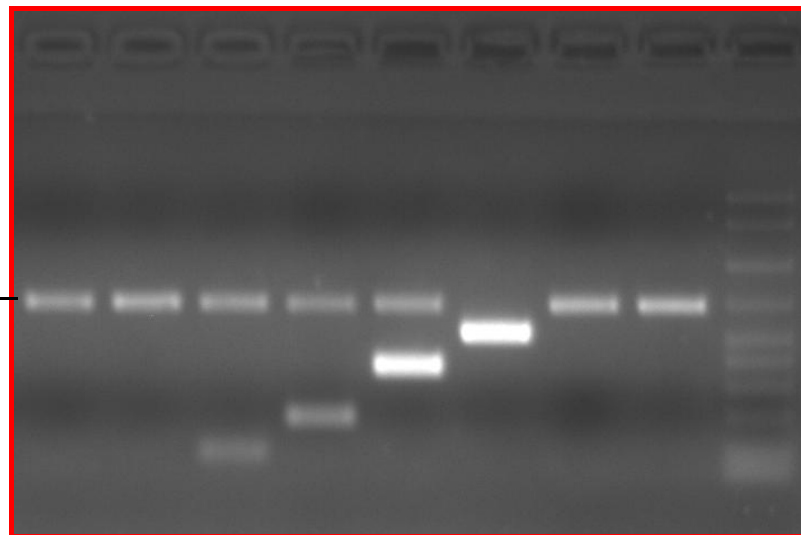
Verificato Responsabile Struttura Semplice:
P. DE SANTIS 

Verificato RQ:
S. GUZZO 

QualitàQualitàQualitàQualitàQualitàQualitàQualità
Approvato Responsabile di Struttura Complessa:



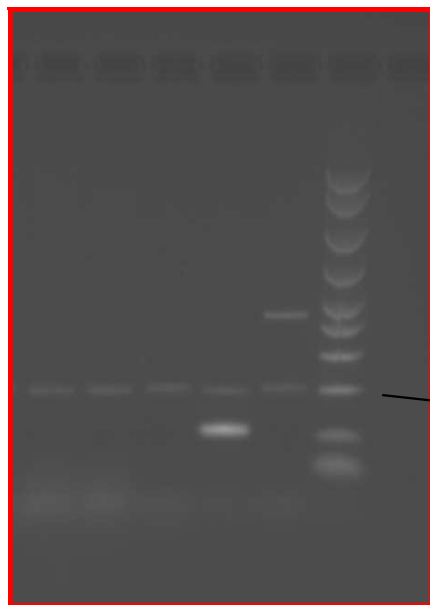
TOSSINE BOTULINICHE TIPO A, B, C, D, E, F
(PCR MULTIPLEX)



Geni per tossine tipo A, B, E, F

IAC:internal amplification control


Geni per tossine tipo C e D





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



	DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA ALIMENTARE AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
CNRB31.001	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR	REV. 1






Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

DO CONTROLLO ALIMENTI
POS 012 NOR rev. 0 del
TOSSINE BOTULINICHE TIPO A,B,C,D,E,F (MULTIPLEX REAL-TIME PCR)

PG QUA 005/11 b rev. 22 pag. 1 di 13


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

TOSSINE BOTULINICHE TIPO A,B,C,D,E,F
(MULTIPLEX REAL-TIME PCR)

Redatto:

La presente procedura si
basa su protocolli di
multiplex real-time PCR
che utilizzano sonde “a
idrolisi LNA™” per la
determinazione simultanea
dei geni che codificano per
le tossine botuliniche,
previa estrazione degli
acidi nucleici dalle colture
di arricchimento mediante
lisi delle cellule batteriche.



Vantaggi nuova procedura:

- PCR real time più rapida
- Identificazione di varianti dei geni per le tossine botuliniche (es. mosaici CD o DC)
- Controllo di processo

Microrganismo contenente un gene target utilizzato per monitorare la reazione di PCR a partire dall'estrazione degli acidi nucleici.

C. botulinum non tossigeno (CRB collezione n. CL14 n.t.)



PRINCIPIO DEL METODO

- 1) **semina del campione** da analizzare in idonei terreni colturali di arricchimento per aumentare il numero di cellule di clostridi produttori di tossine botuliniche, per favorire la loro determinazione;
- 2) **estrazione degli acidi nucleici** dalle colture di arricchimento, mediante lisi delle cellule batteriche;
- 3) **amplificazione degli acidi nucleici** estratti, mediante determinazione simultanea dei geni che codificano per le tossine botuliniche secondo i due schemi di 5-plex realtime PCR sotto indicati:
bont/A + bont/B + bont/E + bont/F + CP;
bont/C + bont/D + bont/CD + bont/DC + CP.



Tipologia di campione da sottoporre ad analisi

- Campioni alimentari
- Colture di arricchimento
- Campioni biologici (feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti e organi interni)
- Campioni ambientali
- Mangimi



Tipologia di campione da sottoporre ad analisi

nota 1



○ **Campioni alimentari**

Campioni alimentari e
mangimi in porzione test da
25 g

Miele

Campioni disidratati

Residui di campioni alimentari



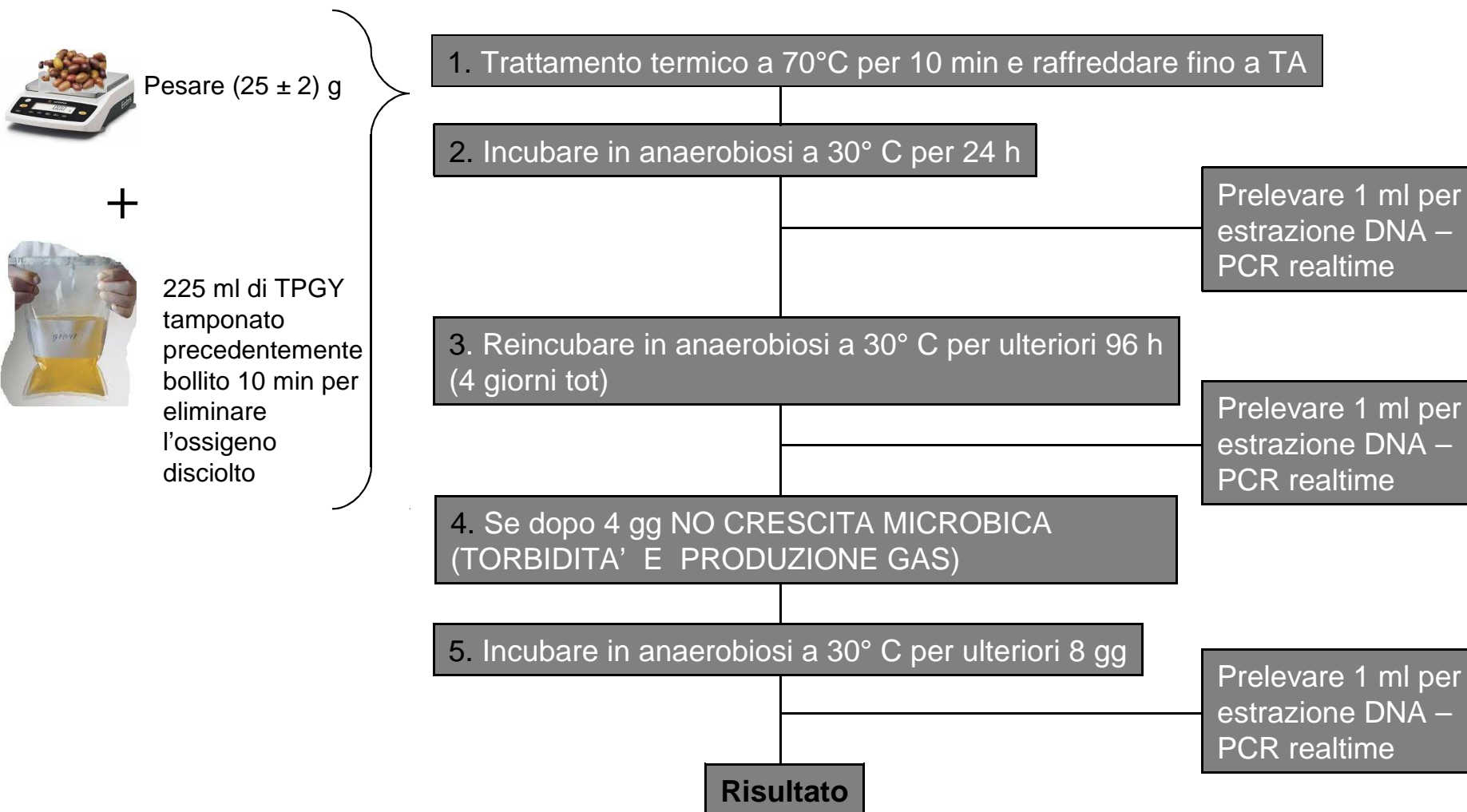
○ **Culture di arricchimento**

Se si analizzano campioni riferibili al **botulismo animale** il terreno TPGY deve essere sostituito dal **terreno CMF**. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

○ **Campioni fecali, tessuti ed organi interni**



Campioni alimentari e mangimi in porzione test da 25 g



**Residui di
campioni
alimentari**

sospensione
campione/tampone
fosfato gelatina in
rapporto 1:1.

Prelevare 2 ml della
sospensione e seminare in
9 ml di TGPY

Procedere come per i campioni
alimentari dal pto 1

**Campioni
fecali, tessuti
e organi**

sospensione
campione/tampone
fosfato gelatina in
rapporto 1:1.

Prelevare 2 ml della
sospensione e seminare in
9 ml di CMF

Procedere come per i campioni
alimentari dal pto 1

MIELE

Campione a bagnomaria
a 50 °C per 30 min
mescolare

Pesare 25 g + 50 ml (H₂O +
tween 80 preriscaldata a 50 °C)

Mescolare fino a scioglimento.

Centrifugare a 8000 X g per 30 min

Fase liquida

Filtrare con
filtro 0,45µm

Seminare filtro
in 9 ml TGPY

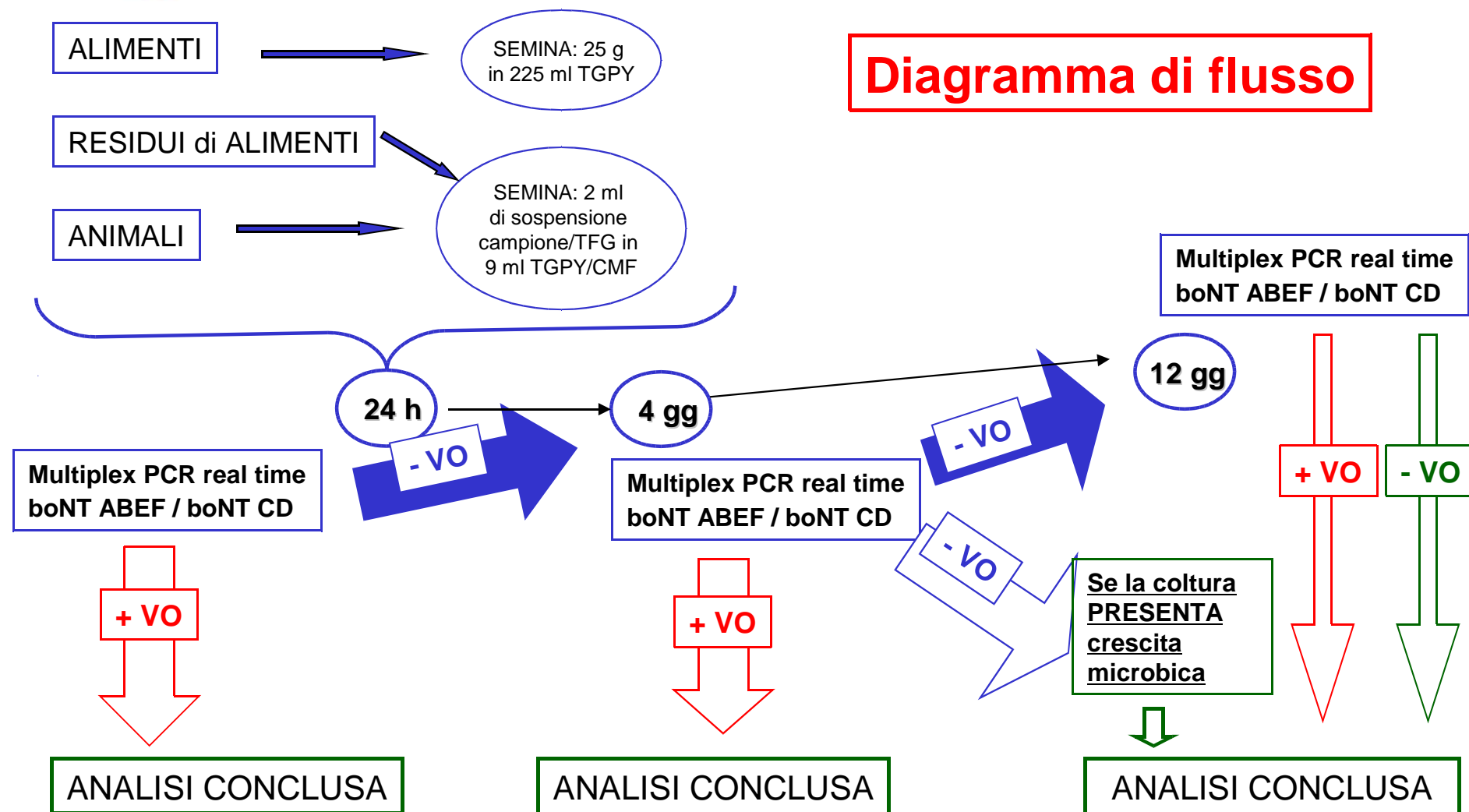
Sedimento

Seminare
sedimento in
9 ml TGPY

Procedere come per i campioni
alimentari dal pto 1



Diagramma di flusso



2) ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

- ✓ 1 ml della coltura di arricchimento da analizzare e 100 µl della sospensione di lavoro del CP
- ✓ centrifugare a 12000 x g per 5 minuti
- ✓ Lavare il pellet con 1.0 ml di acqua penta distillata
- ✓ centrifugare nuovamente a 12000 x g per 5 min
- ✓ risospendere il pellet in 300 µl di Chelex-100
- ✓ omogeneizzazione in vortex
- ✓ porre in bagnomaria acqua oppure in termo blocco riscaldato alla temperatura di (56 ± 1) °C per 20 minuti, agitando in vortex ogni 5 minuti
- ✓ vortexare ogni provetta per 10 secondi
- ✓ incubare a (99 ± 1) °C per 8 minuti
- ✓ mettere i campioni in bagno di ghiaccio
- ✓ vortexare per almeno 10 secondi per facilitare la rottura delle cellule microbiche
- ✓ centrifugare a 12000 x g per 5 minuti
- ✓ prelevare circa 200 µl del surnatante ed utilizzarne un'aliquota come template per la multiplex real-time PCR



3) AMPLIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

3.1) Preparazione della mix di reazione

Mastermix Qiagen Quantitect multiplex Real-Time PCR

primers

sonde ad LNA*

MgCl₂

H₂O

Volume totale di reazione: 25µl

QuantiTect Multiplex PCR noROX MasterMix Qiagen		
	Conc. finale	µl/reazione
Master mix	1x	12,50
Prim ANI C*	200 nM	0,10
Prim ANI D*	300 nM	0,20
Prim ANI CD*	600 nM	0,30
Prim ANI DC*	600 nM	0,30
Prim ANI CP*	600 nM	0,30
Probe ANI C (HEX)	100 nM	0,25
Probe ANI D (FAM)	100 nM	0,25
Probe ANI CD (cy5)	100 nM	0,25
Probe ANI DC (Alexa350)**	300 nM	0,75
Probe ANI CP (ROX)	50 nM	0,125
MgCl ₂ ***	9.5 mM	4,00

Pag. 30 di 42

E' vietata la riproduzione anche parziale del presente documento

QuantiTect Multiplex PCR noROX MasterMix Qiagen		
	Conc. finale	µl/reazione
Master mix	1x	12,50
Prim A*	600 nM	0,30
Prim 3B*	600 nM	0,30
Prim E*	600 nM	0,30
Prim F*	600 nM	0,30
Prim 4GyrB*	600 nM	0,30
Probe A (HEX)	100 nM	0,25
Probe 3B (FAM)	100 nM	0,25
Probe E (cy5)	100 nM	0,25
Probe F (Alexa350)**	300 nM	0,75
Probe 4GyrB (ROX)	50 nM	0,125
MgCl ₂ ***	9.5 mM	4,00
H ₂ O****		2,375
DNA – template		3,00

* = mix dei primers (senso e antisenso)

** = tale sonda può essere marcata anche con il fluoro foro cy 5.5. In questo caso la concentrazione finale è 200 nm invece di 300 nM

*** = la master mix contiene già MgCl₂ al 5.5 Mm

**** = la quantità di acqua va incrementata di 0.25 µl/reazione in caso si utilizzi la sonda Probe F marcata con il fluoroforo cy 5.5.

* Basi LNA: sono basi azotate contenenti come zucchero pentoso ribosio modificato. Questo permette un aumento della temp. di melting. Migliora l'analisi in PCR di genomi poveri in GC





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

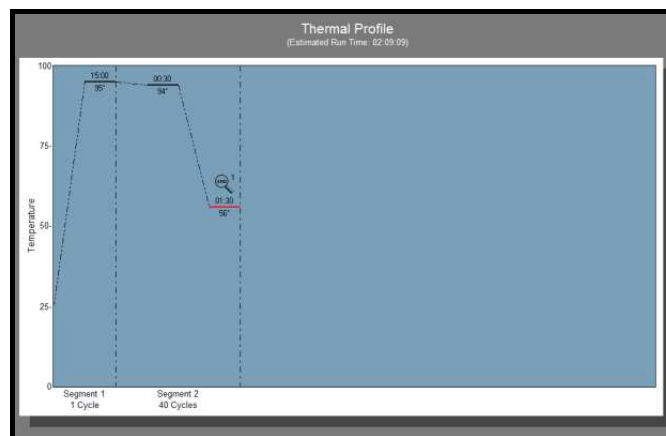
3.2) Caricamento piastra e parametri amplificazione

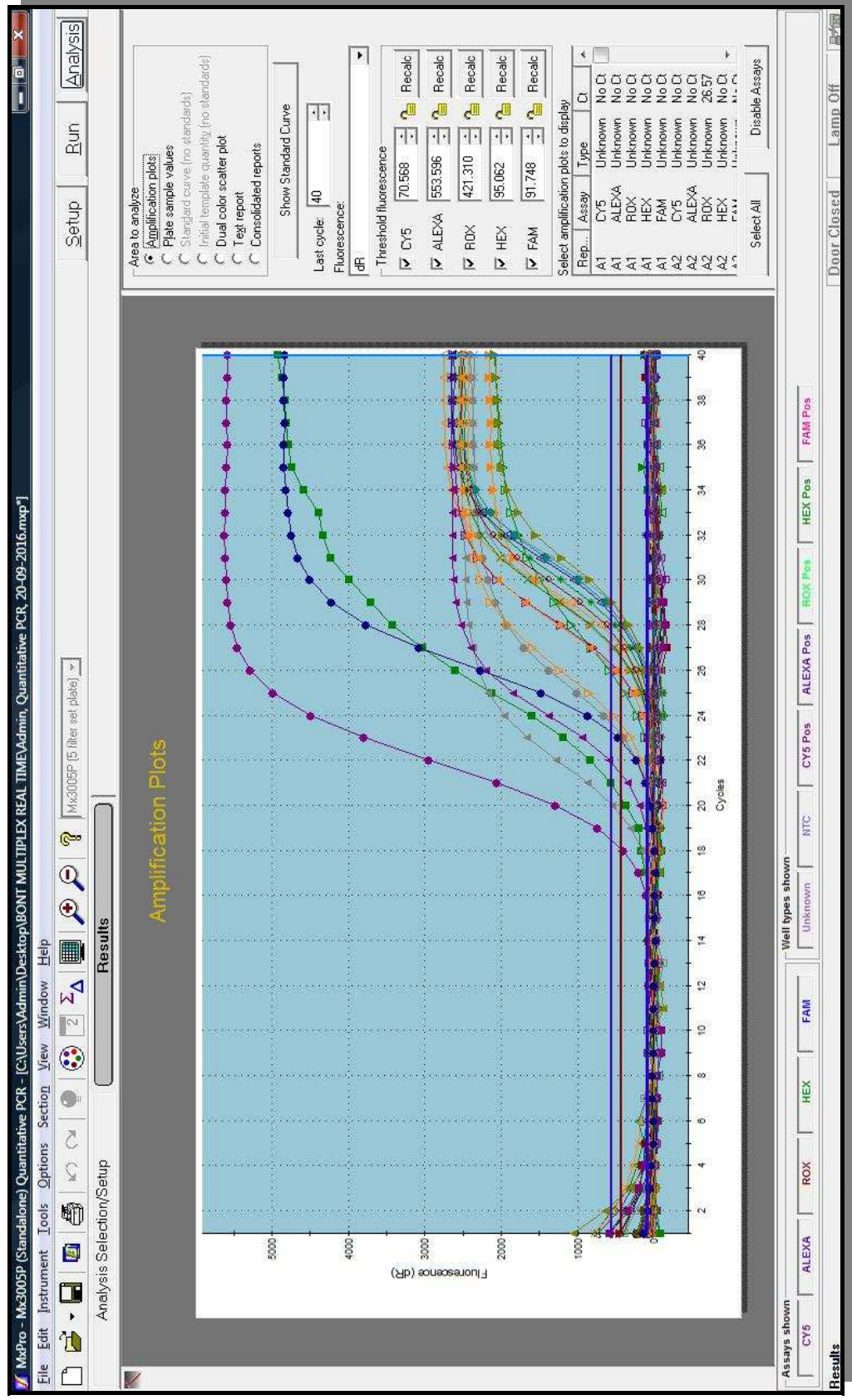
- Campioni
- Cntr pos bont A/bont C (fluoroforo HEX)
- Cntr pos bont B/bont D (fluoroforo FAM)
- Cntr pos bont E/bont CD (fluoroforo Cy5)
- Cntr pos bont F/bont DC (fluoroforo Alexa)
- Cntr pos CP (fluoroforo ROX)
- NTC (no template control – acqua)

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	FAM Pos ⁺ CYS ALEXA ROX HEX FAM									
B	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	CYS Pos ⁺ CYS ALEXA ROX HEX FAM									
C	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	ALEXA Pos ⁺ ALEXA ROX HEX FAM									
D	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	ROX Pos ⁺ ROX HEX FAM									
E	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	NTC CYS ALEXA ROX HEX FAM									
F	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM										
G	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM										
H	Unknown CYS ALEXA ROX HEX FAM	HEX Pos ⁺ HEX FAM										

PROFILO TERMICO

95 °C	15 min	1 ciclo
94 °C	30 sec	40 cicli
56 °C	90 sec	

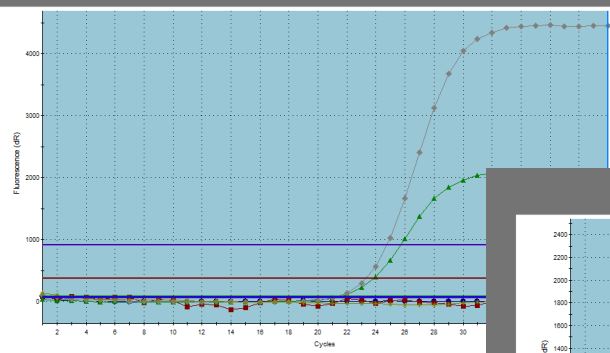






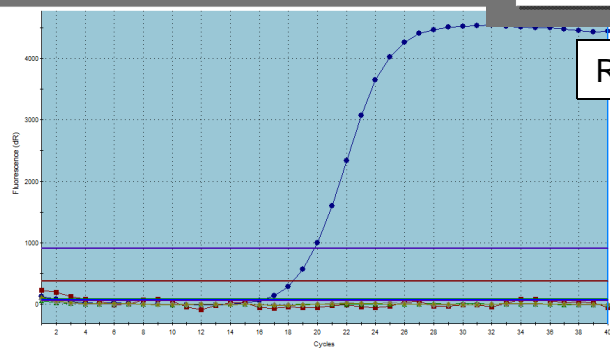
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Amplification Plots



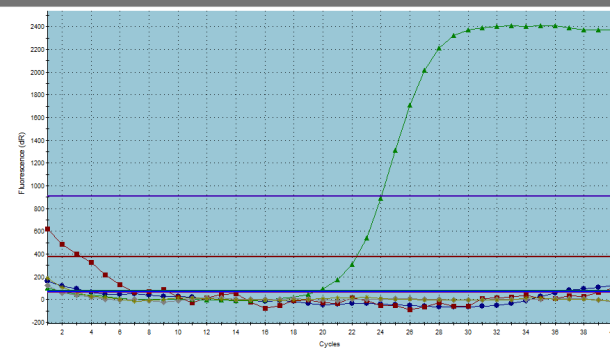
HEX positive control = cntr + bont
+ CP ROX

Amplification Plots



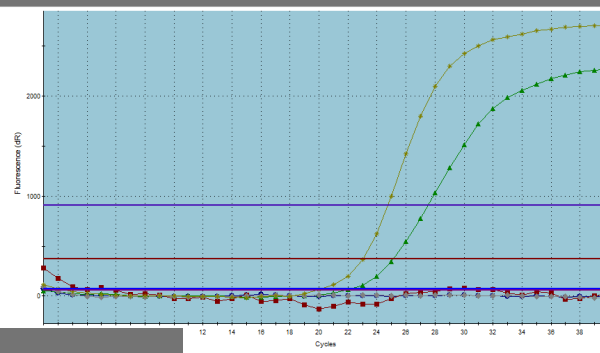
Cy5 positive control = cntr + bont E

Amplification Plots



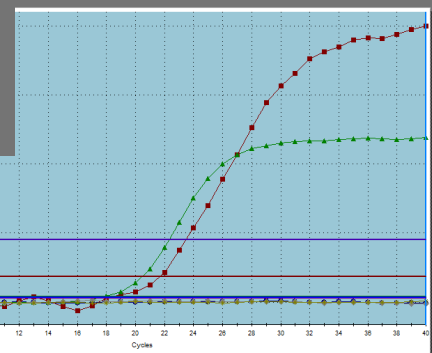
ROX positive control = cntr + CP

Amplification Plots



e control = cntr + bont B

Amplification Plots

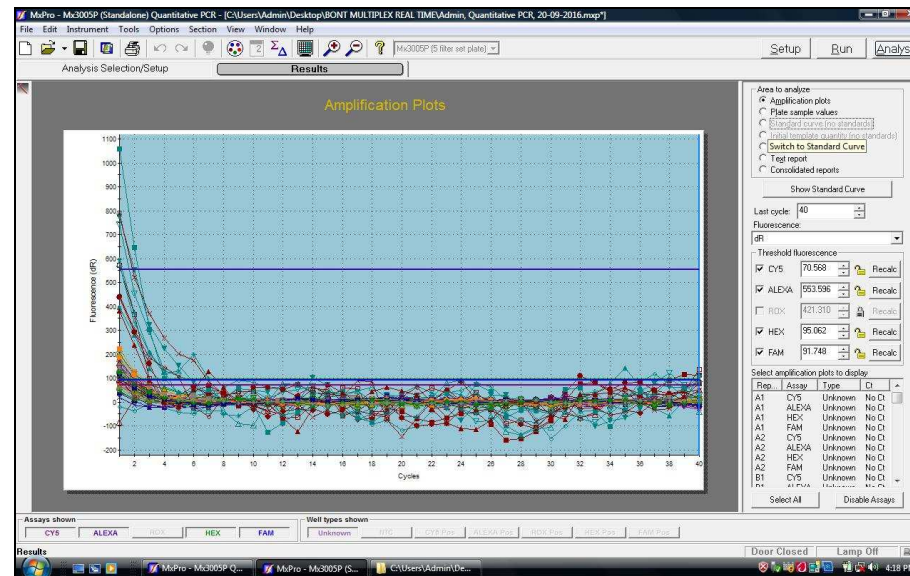
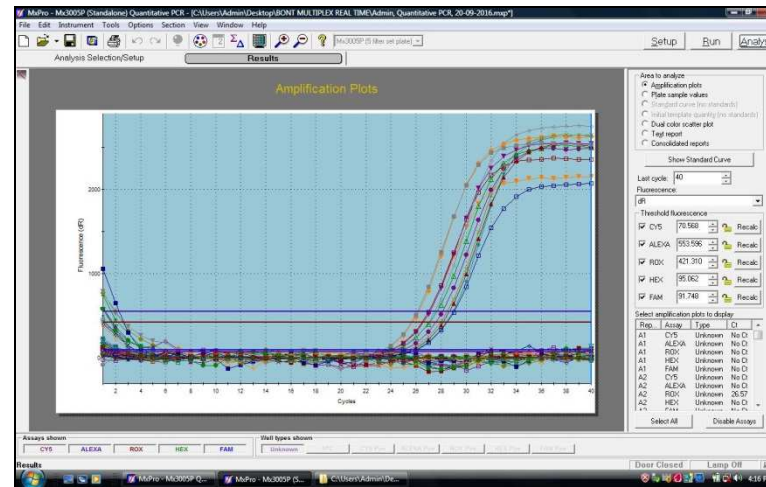
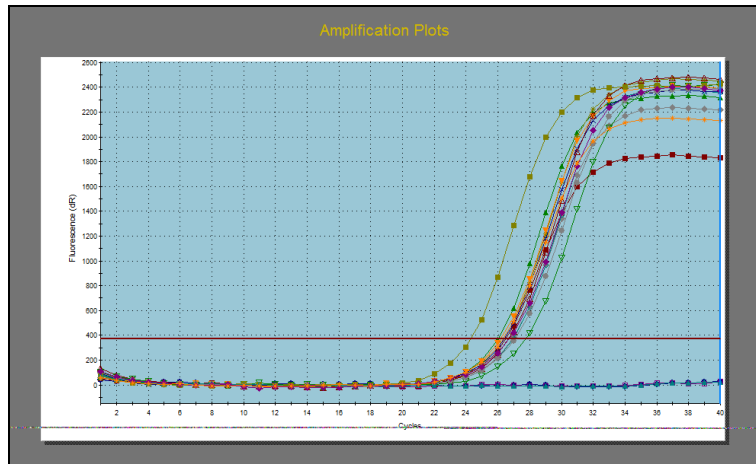


Alexa positive control = cntr + bont F
+ CP ROX





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



A: analisi del CP nei campioni

B: analisi di tutti i target nei campioni

C: analisi dei target nei campioni senza
il fluoroforo ROX specifico del CP



ESPRESSIONE DEI RISULTATI (1)

La prova è considerata valida se:

- è presente la curva specifica del CP nei campioni
- per ogni controllo positivo è presente la relativa curva di amplificazione
- non è presente alcuna curva di amplificazione per il controllo negativo

La prova è considerata positiva se:

- si osserva l'incremento della fluorescenza di uno o più fluorofori con cui sono marcate le sonde relative a ciascun gene delle tossine botuliniche
- il valore del Ct di ciascuna sonda è minore di 35

La prova è considerata negativa se:

- nei campioni si osserva solo l'incremento della fluorescenza del fluoroforo per il CP.
- si osservano valori di Ct maggiori di 35 per uno o più fluorofori con cui sono marcate le sonde relative a ciascun gene delle tossine botuliniche.



ESPRESSIONE DEI RISULTATI (2)

Il risultato è espresso solo **in termini qualitativi** ovvero di presenza o assenza dei geni che codificano le tossine botuliniche nel/i campione/i analizzato/i

Rilevata presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nel/i campione/i analizzato/i (prova positiva)

**TIPO A,B,E,F “positivo” o
TIPO C,D “positivo”**

In caso di positività, nel campo “**Note**”, sarà indicata la tossina, o le tossine, per la quale si è avuta la positività.

Non rilevata presenza dei geni che codificano per le tossine botuliniche nel/i campione/i analizzato/i (prova negativa)

**TIPO A,B,E,F “negativo” o
TIPO C,D “negativo”.**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

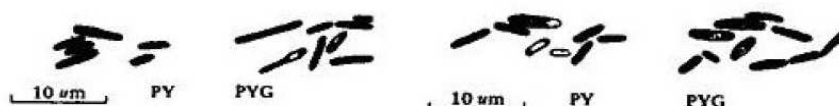
GRAZIE
dell'ATTENZIONE



NOTA 1: Può essere utile effettuare l'osservazione microscopica delle forme microbiche presenti nel campione da sottoporre ad analisi. I clostridi produttori di tossine botuliniche appaiono come bastoncelli sporigeni Gram positivi. Particolarmente importante risulta la posizione e la forma delle spore. *C. botulinum* appare come un bastoncello con spora debordante in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare, che assume la forma di una racchetta da tennis. *C. butyricum* appare come un bastoncello con spora non debordante in posizione centrale rispetto al corpo bastoncellare, che assume la forma di una spilla da balia. *C. baratii* appare come un bastoncello con spora non debordante in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare (**Appendice n. 1**).

Appendice 1

MORFOLOGIA DEI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE OSSERVATI AL MICROSCOPIO OTTICO.



Clostridium botulinum, type A.

Clostridium butyricum.



Clostridium baratii.



Residui di campioni alimentari

Per i campioni alimentari può essere utile eseguire la misurazione di:

- pH
- a_w (acqua libera)

A valori di **pH minori di 4,6** e **a_w minore di 0,935** i clostridi produttori di tossine botuliniche non sono in grado di crescere e di produrre le tossine botuliniche

