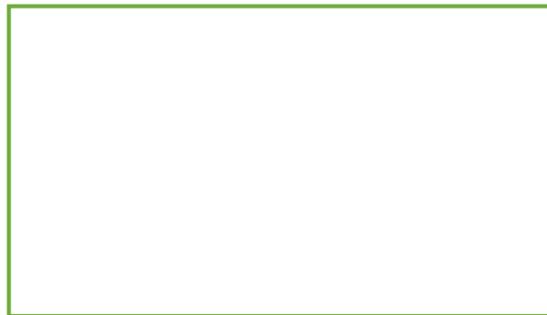




Viale Piceno 137/f
61032 Fano PU (IT)
Telephone + 39 (0) 721830605
FAX +39 (0)721837154
e-mail: info@diatheva.com
www.diatheva.com



STEC FLUO Detection kit

MBK0068

50 reazioni

UTILIZZO

STEC FLUO detection kit consente la rilevazione dei geni *stx 1* e *2* (variante *f* inclusa) ed *eae* di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossine (STEC), in accordo con i requisiti specificati nella normativa ISO/TS 13136:2012 e metodo USDA MLG 5B.02.

INTRODUZIONE

E.coli è un microrganismo normalmente presente come commensale nell'intestino di uomo ed animali, tuttavia alcuni sierotipi hanno acquisito fattori di virulenza che gli hanno permesso di adattarsi a nuove nicchie ecologiche ed in alcuni casi, di causare patologie nell'uomo. Tra questi gli *E. coli* produttori di Shiga tossine (STEC), sono stati implicati in episodi di malattie con gravi manifestazioni enteriche e complicazioni quali infezioni del tratto urinario, setticemia/meningiti, enteriti, colite emorragica e sindrome emolitico uremica. In Nord America, Giappone ed in diverse zone dell'Europa la maggior parte delle epidemie sono causate da ceppi appartenenti al sierotipo O157:H7, tuttavia anche altri sierogruppi quali l'O26, O103, O111 e O145 rappresentano un'importante causa di infezione (Farrokh *et al.*; 2013). Acqua ed alimenti sono soggetti a contaminazione fecale da ruminanti e possono rappresentare una minaccia per la sicurezza alimentare.

STEC FLUO detection kit consente la ricerca dei geni *stx 1-2* ed *eae* a partire da campioni alimentari sottoposti ad arricchimento o direttamente da colonia attraverso una reazione di multiplex Real-Time PCR.

Il kit fornisce una miscela pronta all'uso nella quale è incluso anche un controllo interno di amplificazione (IAC) che consente di poter individuare eventuali inibizioni della reazione da parte di contaminanti derivati dall'estrazione.

SENSIBILITA'

1 ufc/25 gr dopo arricchimento.
Limite di rilevazione (LOD): 10 Unità Genomiche (U.G.).

SPECIFICITA'

La specificità del saggio è stata verificata attraverso l'amplificazione di alcuni ceppi di VTEC che coprono tutte le varianti note dei geni *stx1*, *stx2* ed *eae* (inclusività) e di altri appartenenti a specie non target (esclusività). I risultati ottenuti sono del 100% per entrambi i parametri.

CONTENUTO DEL KIT

STEC Master Mix : 2 x 500µl
Hot rescue DNA Polymerase (5U/µl): 1 x 10µl
DNase free water: 1 x 1000µl
ROX: 2 x 5µl
Dilution Buffer: 1 x 1000µl
Positive control: 1 x 100µl

MATERIALE NON FORNITO NEL KIT

- Guanti
- Pipette
- Puntali sterili con filtro
- Tubi sterili da 1.5 e 0.2 ml
- Vortex
- Centrifuga

CONSERVAZIONE

Conservare tutti i reagenti a -20 °C, al riparo dalla luce. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo poiché potrebbero causare una riduzione delle performances del kit. In caso, si consiglia di aliquotare i reagenti e di non effettuare più di due scongelamenti di ogni reagente.

PRECAUZIONI GENERALI

- Mantenere aree separate per la preparazione/estrazione dei campioni e per l'allestimento della Real-Time PCR;
- Utilizzare puntali con il filtro;
- Conservare campioni, standard e amplificati in un'area separata dagli altri reagenti del kit;
- Sia i campioni che i reagenti devono essere perfettamente scongelati e vortexati alcuni secondi prima dell'utilizzo.

PROTOCOLLO

1.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Campione alimentare

E' fortemente consigliato l'uso di sacchetti con filtro per la fase di arricchimento. Equilibrare il terreno di arricchimento a temperatura ambiente prima dell'uso. Preparare il campione in un sacchetto con filtro prelevando **x** gr di alimento e diluendoli in **y** ml di terreno. Miscelare ed incubare il campione; riferirsi alla normativa ISO/TS 13136 o metodo USA MLG 5B.02 per maggiori informazioni.

Al termine della fase di arricchimento, procedere all'estrazione del DNA attraverso il *Fast DNA Extraction kit* (Diateva, Cod. MBK0061) o il *Bacterial DNA isolation single step* (Diateva cod. MBK0063) secondo le indicazioni fornite nel product information.

Il DNA così ottenuto può essere immediatamente utilizzato per l'amplificazione.

Colonia

1. Aliquotare 100 µl di acqua sterile in una provetta da 1.5 ml;
2. Prelevare con ansa sterile la colonia da analizzare e stemperare l'ansa nella provetta preparata nello step precedente;
3. Bollire il campione per 10 minuti;
4. Centrifugare a 14 000 rpm per 10 minuti;
5. Prelevare il surnatante evitando il pellet presente sul fondo della provetta ed inserirlo in una nuova provetta da 1.5ml;
6. Miscelare con vortex il campione ed amplificare 2 µl del campione così ottenuto (vedi punto 1.2 e 1.3).

1.2 ALLESTIMENTO REAL-TIME PCR

- Scongelare i componenti al riparo dalla luce, vortexare per 10" e centrifugare brevemente.
- Al momento del primo utilizzo della STEC Master Mix, per gli strumenti che lo richiedono (es. Applied Biosystems) è necessario aggiungere il ROX. Diluire il ROX (5 µl) mediante l'aggiunta di Dilution Buffer in base alla tipologia di strumentazione per per Real-Time.

Strumento	ABI Prism® 7300, 7500	ABI Prism® 7000, 7700, 7900HT SDS GeneAMP5700)
Volume di Dilution buffer da aggiungere al ROX	195 µl	45 µl

Nota: si consiglia di diluire il ROX solo prima dell'utilizzo e direttamente nel vial di ROX fornito. Il kit fornisce 2 vial di ROX una per ciascun vial di STEC Master Mix

- Vortexare per 20 secondi e centrifugare brevemente.
- Procedere con il completamento della STEC Master Mix (direttamente nel vial nel quale viene fornita) con l'aggiunta di ROX o Dilution buffer secondo lo schema seguente in base allo strumento disponibile. Dopo l'aggiunta miscelare vortexando 10":

	Per 1 vial da 500 µl	Per 1 vial da 500 µl	Per 1 vial da 500 µl
Strumento Real-Time PCR	ABI Prism® 7300, 7500	ABI Prism® 7000, 7700, 7900HT SDS GeneAMP 5700)	Bio-Rad/ Rotor-GeneQ, Rotor-Gene 6000 Stratagene 3005/3000p
STEC Master Mix	500 µl	500 µl	500 µl
ROX	4.5 µl	4.5 µl	-
Dilution buffer	-	-	4.5 µl

- In un tubo sterile da 1.5 ml preparare la miscela di amplificazione necessaria per il numero di campioni che si desidera analizzare più un controllo negativo (NTC) ed un controllo positivo seguendo lo schema di seguito riportato:

	Per 1 campione*
STEC master mix	19.8 µl
DNA polymerase	0.2 µl
Totale	20 µl

* Per l'analisi di più di un campione, occorre semplicemente moltiplicare i volumi di mix e di DNA Polymerase per il numero di campioni che si desidera testare considerando anche di processare anche 1 NTC e 1 Positive Control. Si consiglia di eseguire i calcoli per un campione in eccesso.

- Vortexare per 10" il tubo in cui è stata allestita la miscela per l'amplificazione e centrifugare brevemente;
- Aliquotare 20 µl della miscela preparata come sopra indicato nei tubi da 0.2 ml, o in alternativa nella piastra predisposta per l'esperimento;
- Aggiungere 5 µl di DNase free water nell' NTC;
- In un'area separata, aggiungere 5 µl dei campioni di DNA** che si desidera testare, preparati come indicato nella sessione 1.1, nei tubi corrispondenti in cui è stata aliquotata la miscela per l'amplificazione;
- Aggiungere 5 µl di Positive Control nel tubo corrispondente.

** amplificare solo 2 µl dei campioni di DNA estratti da colonia e portare la reazione a volume finale (25 µl) aggiungendo 3 µl di DNase free water.

1.3 CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE

Il kit è compatibile con diversi termociclatori per Real-Time PCR. A seguire le impostazioni da utilizzare per termociclatori quali Rotor-Gene 6000 series, Rotor-Gene Q e ABI PRISM 7500. Per strumenti diversi da quelli sopra citati potrebbero essere necessarie impostazioni diverse da quelle di seguito riportate. In questo caso si consiglia di contattare il servizio tecnico Diatheva.

Programmare il termociclatore come segue, con volume finale di reazione pari a 25 µl:

Fase	Temperatura	Tempo	CICLI
Denaturazione iniziale	95°C	10min	1X
Denaturazione	95°C	15 sec	45X
Annealing-Estensione	60°C	60sec	

La fluorescenza deve essere rilevata durante la fase di annealing-extension nei canali di lettura Green (FAM; ex 495 nm-em 520 nm); Yellow (VIC/JOE/HEX; ex 538-em 554 nm) e Red (Cy5/Quasar 670 dye,ex 647-em 667 nm). Se richiesto selezionare l'opzione NFQ (non fluorescent quencher) per ogni fluoroforo rilevato. Negli strumenti che lo consentono impostare l'ottimizzazione del gain nei canali di acquisizione Green, Yellow e Red in posizione 1 (NTC).

NOTA: per gli strumenti che lo richiedono (es. Applied Biosystems) impostare il ROX dye come passive reference.

Target	Canale di acquisizione
<i>stx1-2</i>	Green (FAM; ex 495-em 520 nm)
<i>eae</i>	Red (Cy5, Quasar 670; Ex 647-em 667 nm)
<i>IAC</i>	Yellow (VIC, Cal fluor orange 560; Ex 538-Em 554 nm)

1.4 ANALISI DEI RISULTATI

L'analisi dei risultati deve essere eseguita con il programma in dotazione secondo le raccomandazioni fornite dalla casa produttrice dello strumento. In alcuni casi è possibile che il programma fornisca automaticamente l'impostazione della baseline. In questo caso si suggerisce di verificare tali impostazioni.

Per una corretta definizione del threshold è necessario selezionare un valore ben distinto dal background dopo la fase di crescita lineare. Analizzare ogni campione nei tre canali di acquisizione (Fig. 1).

1.5 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Controlli: affinché l'esperimento possa essere considerato attendibile, prima di procedere con l'analisi dei campioni occorre verificare che i controlli di reazione abbiano dato i seguenti risultati:

	stx1 e stx2 (green, FAM)	Eae (red, Cy5, Quasar 670)	Controllo interno di amplificazione (yellow, VIC, Cal fluor orange 560)
Controllo negativo	Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	20≤Ct≤32
Controllo positivo	15≤Ct≤25	18≤Ct≤28	Non significativa*

*L'amplificazione in questo canale potrebbe anche non essere presente

Campioni: per procedere con l'interpretazione dei risultati è opportuno assicurarsi che i segnali osservati presentino il tipico andamento di una curva di amplificazione. Se il valore di Ct nei canali target è inferiore a 10, visualizzare il dato grezzo e verificare che l'andamento della curva di amplificazione sia regolare. Se corretto il campione può essere considerato positivo.

stx1 e stx2 (green, FAM)	Eae (red, Cy5, Quasar 670)	Controllo interno di amplificazione (yellow, VIC, Cal fluor orange 560)	Interpretazione
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	$20 \leq Ct \leq 32$	Negativo
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Inibizione
$Ct \geq 10$	$Ct \geq 10$	L'amplificazione in questo canale non è significativa e potrebbe anche non essere presente	Positivo: Rilevazione presuntiva di STEC. Necessarie ulteriori conferme secondo ISO/TS 13136.
$Ct \geq 10$	Nessuna amplificazione	L'amplificazione in questo canale non è significativa e potrebbe anche non essere presente	Positivo: Rilevazione presuntiva di STEC. Necessarie ulteriori conferme secondo ISO/TS 13136.

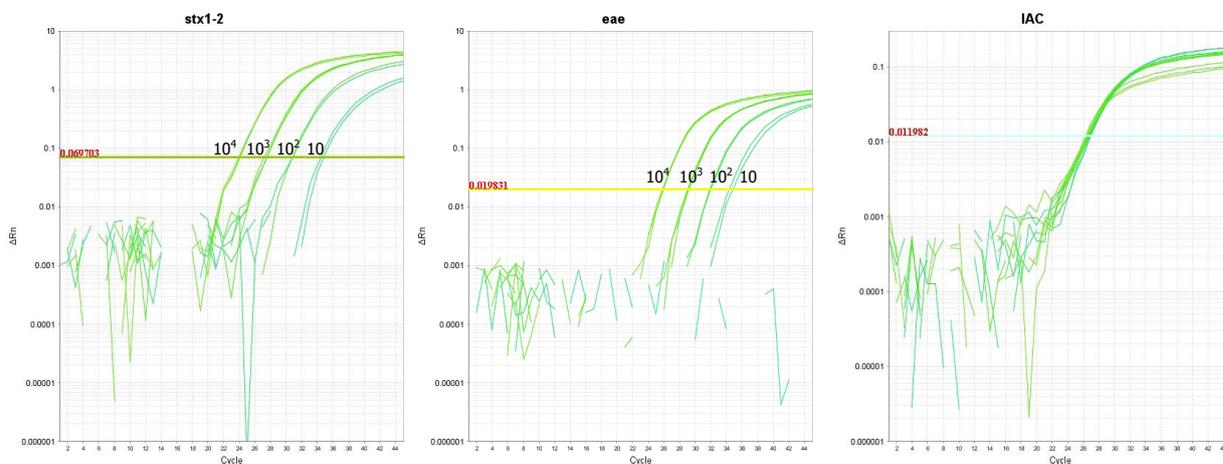


Fig. 1: Profili di amplificazione dei target stx 1 e 2, eae e controllo interno di amplificazione.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Osservazione	Possibile causa	Possibili soluzioni
Nessuna amplificazione dei campioni o del controllo	Possibile errore nella programmazione del termociclatore	Ripetere la reazione e verificare che le impostazioni siano corrette
	Errore di pipettamento	Verifica delle pipette e ripetizione del test
	Possibile degradazione dei reagenti	Verificare la corretta conservazione dei reagenti
Nessuna amplificazione del controllo		Possibile inibizione della reazione di PCR. Ripetere la purificazione del campione e in caso valutare se diluirlo prima dell'amplificazione
Amplificazione nell' NTC	È dovuta ad una contaminazione della reazione	Accurata pulizia dei locali e della strumentazione

BIBLIOGRAFIA

Choreh Farrokh, , Kieran Jordan, Frederic Auvrayc, Kathleen Glass,, Hanne Oppegaard, Sabrina Raynaud, Delphine Thevenot, Robin Condron, Koen De Reu Alexander Govaris Klaus Heggum Marc Heyndrickx Joerg Hummerjohann Denise Lindsay Stephane Miszczycha Sylvie Moussiagt Karen Verstraetei Olivier Cerf, 2013. Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production, International Journal of Food Microbiology Volume 162, Issue 2.

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.

United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science, MLG 5B.01, Detection and Isolation of non-O157 Shiga-toxin Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.

NOTE: Le componenti fluorescenti contenute nel presente prodotto sono concesse in licenza da Biosearch Technologies, Inc. e sono protette da brevetti statunitensi e mondiali già emessi o in applicazione. La licenza riguarda le applicazioni nell'ambito della sicurezza alimentare, della ricerca e sviluppo ed i prodotti marcati IVD"