



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 Serotypes FLUO kit

MBK0074 25 reazioni per ogni sierotipo

UTILIZZO

STEC Serotypes FLUO kit consente l'identificazione dei sierotipi di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossine (STEC) precedentemente risultati positivi ai geni *stx* e/o *eae* (STEC FLUO Detection kit-MBK0068, Diatheva). Il kit è stato sviluppato in accordo con i requisiti specificati nella norma ISO/TS 13136:2012 ed il metodo USDA MLG 5B.02.

INTRODUZIONE

Gli *E. coli* produttori di verocitotossine (STEC) sono responsabili nell'uomo di severe infezioni dovute al consumo di alimenti contaminati, quali manifestazioni enteriche, infezioni del tratto urinario, setticemie/meningiti, enteriti, coliti emorragiche e sindrome emolitico uremica. La maggior parte delle epidemie sono causate da strains appartenenti al sierotipo O157:H7, tuttavia studi epidemiologici suggeriscono che il 20-50% delle infezioni causate da STEC sono dovute a strains non-O157, come l'O26, O103, O111 e l'O145 (Farrokh *et al.*; 2013).

STEC Serotypes FLUO kit consente l'identificazione del sierotipo di STEC presente nel campione attraverso una reazione di multiplex-Real-Time PCR. Il kit è costituito da tre differenti miscele di amplificazione che consentono l'identificazione dei 6 principali STEC: O145-O104-O26-O103-O145-O157. Ogni miscela presenta un controllo interno di amplificazione (IAC) che permette di poter rilevare un eventuale inibizione della reazione da parte di contaminanti derivanti dall'estrazione di DNA.

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 dei sierotipi O145-O104-O26-O103-O145-O157 (inclusività) e di altre specie non target (esclusività). I risultati ottenuti sono del 100% per entrambi i parametri.

CONTENUTO DEL KIT

Master mix O26-O103: 2 x 250 µl
Master mix O145-O104: 2 x 250 µl
Master mix O157-O111: 2 x 250 µl
Hot Rescue DNA Polymerase (5U/µl): 1 x 15 µl
DNase free water: 1 x 1000 µl
Positive Control: 1 x 100 µl
ROX: 6 x 5 µl
Dilution Buffer: 1 x 2000 µl

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 di campioni e per l'allestimento della Real-Time PCR;
- Utilizzare puntali con il filtro;
- Conservare campioni e amplificati in un'area separata dagli altri reagenti del kit;
- I campioni e i reagenti devono essere perfettamente scongelati e vortexati alcuni secondi prima dell'utilizzo.

PROTOCOLLO

1.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il test viene effettuato sullo stesso DNA estratto e testato con STEC FLUO Detection kit (MBK0068, Diatheva).

1.2 ALLESTIMENTO REAL-TIME PCR

- Scongellare al riparo dalla luce i componenti, miscelare con vortex e centrifugare brevemente.
- Al momento del primo utilizzo di ciascuna delle tre 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 Real-Time PCR:

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 6 vial di ROX, una per ciascun vial di Master mix fornito nel kit.

- Vortexare per 20 secondi e centrifugare brevemente.
- Procedere con il completamento di ciascuna Master Mix (direttamente nei vials nelle quali vengono fornite) con l'aggiunta di ROX o Dilution Buffer secondo lo schema seguente:

	Per 1 vial da 250 µl	Per 1 vial da 250 µl	Per 1 vial da 250 µl
Strumento Real-Time PCR	ABI Prism® 7300, 7500	ABI Prism® 7000, 7700, 7900HT SDS GeneAMP5700	Bio-Rad, Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 6000 Stratagene 3005/3000p
Master mix (Master mix O26-O103; Master mix O145-O104; Master mix O157-O111)	250 µl	250 µl	250 µl
ROX	2.25 µl	2.25 µl	-
Dilution Buffer	-	-	2.25 µl

- In tre tubi sterili separati da 1.5 ml preparare le tre miscele di amplificazione, necessarie per il numero di campioni che si desidera analizzare più un controllo negativo (NTC) ed un controllo positivo seguendo lo schema di seguito riportato.

Miscela 1: O26-O103

	Per 1 campione*
Master mix O26-O103	19.8 µl
DNA Polymerase	0.2 µl
Totale	20 µl

	Per 1 campione*
Master mix O145-O104	19.8 µl
DNA Polymerase	0.2 µl
Totale	20 µl

	Per 1 campione*
Master mix O157-O111	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 Master mix e di DNA Polymerase per il numero di campioni che si desidera testare considerando di processare anche 1 NTC ed 1 Positive Control. Si consiglia di eseguire i calcoli per un campione in eccesso.

- Vortexare per 10" ciascun tubo in cui è stata allestita la miscela per l'amplificazione e centrifugare brevemente;
- Aliquotare 20 µl delle miscele preparate 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 nei tre NTC (uno per ogni miscela di amplificazione),
- In un'area separata, aggiungere 5 µl dei campioni di DNA che si desidera testare nei tubi di ciascuna Master Mix,
- Aggiungere per ultimo 5 µl di Positive Control nei tre tubi corrispondenti (uno per ogni miscela di amplificazione).

1.3 CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE

Il kit è compatibile con diversi termociclatori per Real-Time PCR. La seguente reazione è stata ottimizzata con i termociclatori Rotor-Gene 6000 series, Rotor-Gene Q e ABI PRISM 7500. Strumenti diversi da quelli sopra citati potrebbero richiedere modifiche delle condizioni indicate. In questo caso si prega di contattare il servizio tecnico di Diatheva.

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

Fase	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	10 minuti	1X
Denaturazione	95°C	15 secondi	45X
Annealing-Estensione	60°C	1 minuto	

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).

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.

Master Mix	Canale di acquisizione		
	Green	Red	Yellow
Master mix O26-O103	O26	O103	IAC
Master mix O145-O104	O145	O104	IAC
Master mix O157-O111	O157	O111	IAC

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.

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:

	Target 1 Green	Target 2 Red	Controllo interno di amplificazione Yellow
Controlli negativi	Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	$20 \leq Ct \leq 32$
Controlli positivi	$15 \leq Ct \leq 30$	$15 \leq Ct \leq 30$	Non significativa*

*L'amplificazione in questo segnale 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.

Target 1 Green	Target 2 Red	IAC Yellow	Interpretazione
Miscela 1-O26	Miscela 1-O103		
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	$20 \leq Ct \leq 32$	Negativo
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Inibizione
$Ct \geq 10$	$Ct \geq 10$	Non significativa	Positivo a O26 e O103
$Ct \geq 10$	Nessuna amplificazione	Non significativa	Positivo a O26
Nessuna amplificazione	$Ct \geq 10$	Non significativa	Positivo a O103
Miscela 2-O145	Miscela 2-O104		
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	$20 \leq Ct \leq 32$	Negativo
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Inibizione
$Ct \geq 10$	$Ct \geq 10$	Non significativa	Positivo a O145 e O104
$Ct \geq 10$	Nessuna amplificazione	Non significativa	Positivo a O145
Nessuna amplificazione	$Ct \geq 10$	Non significativa	Positivo a O104
Miscela 3-O157	Miscela 3-O111		
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	$20 \leq Ct \leq 32$	Negativo
Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Nessuna amplificazione	Inibizione
$Ct \geq 10$	$Ct \geq 10$	Non significativa	Positivo a O157 e O111
$Ct \geq 10$	Nessuna amplificazione	Non significativa	Positivo a O157
Nessuna amplificazione	$Ct \geq 10$	Non significativa	Positivo a O111

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Osservazione	Possibile causa	Possibili soluzioni
Nessuna amplificazione dei campioni o del controllo	Possibile errore nella programmazione del termociclatore	Ripetere la reazione con le corrette impostazioni
	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.
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 Mischzycha Sylvie Moussiegt 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.