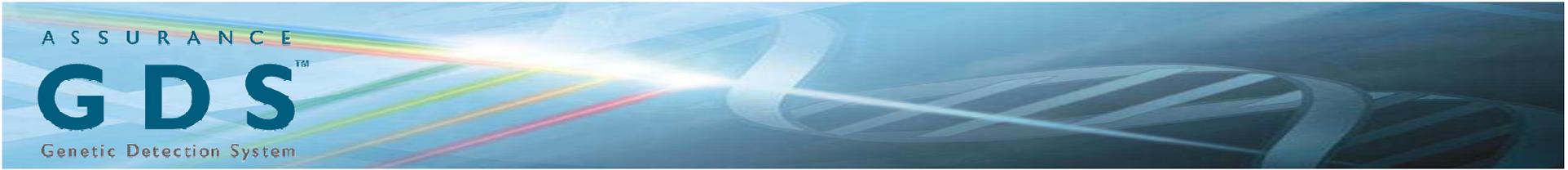


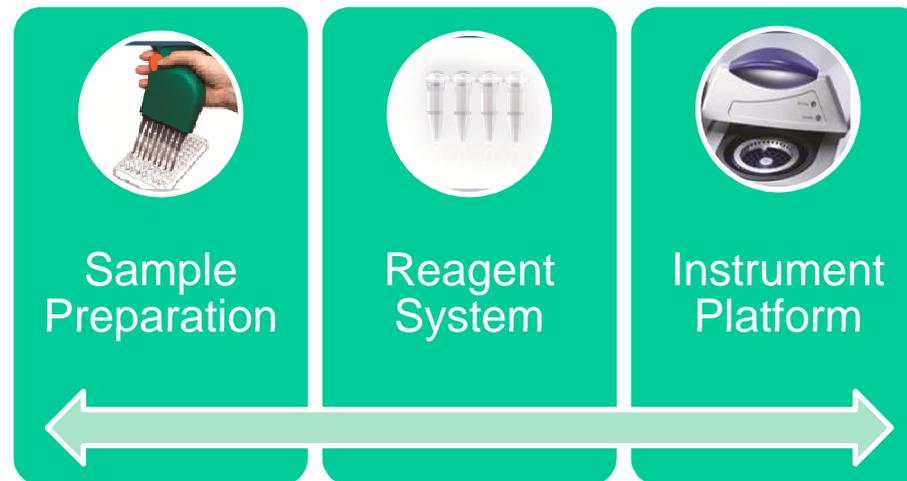
BioControl / Assurance GDS[®]

E. coli (STEC)
Produttori di Shiga Tossine





Sistema Assurance GDS



- Preparazione del campione mediante **Immunoseparazione magnetica IMS**
- Reagenti pronti all'uso
- Termociclatore con riscaldamento e raffreddamento ad aria.



Immuno Separazione Magnetica (IMS)

“Immunoseparazione
Magnetica”

Anticorpi specifici
catturano e separano il
microorganismo target

Cattura -
Gli anticorpi sono
adsorbiti su particelle
paramagnetiche

Separazione -
Con magneti si
recuperano le particelle
su cui sono adesi i
microorganismi target

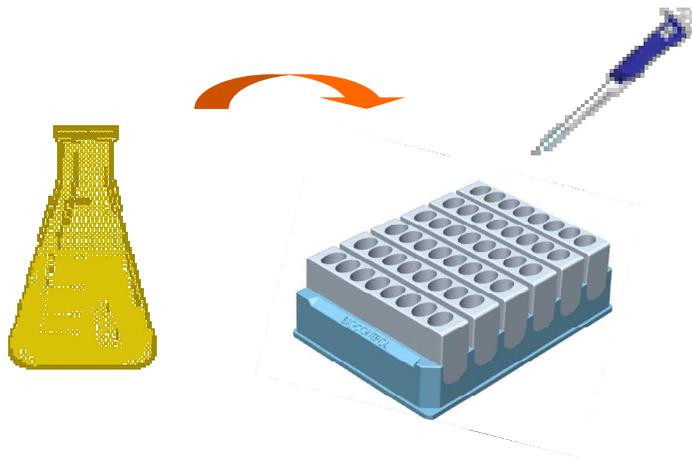


Immuno Separazione Magnetica (IMS)

VANTAGGI:

- **Viene eliminata la flora competitiva**
- **Vengono allontanati i potenziali inibitori della PCR**
(Matrice alimentare, sanificanti, mezzo culturale etc.)
- **Viene incrementata la quantità di DNA per Analisi**

Procedura operativa estremamente semplice



Arricchimento



Vortex 10 min

Aggiunta delle biglie

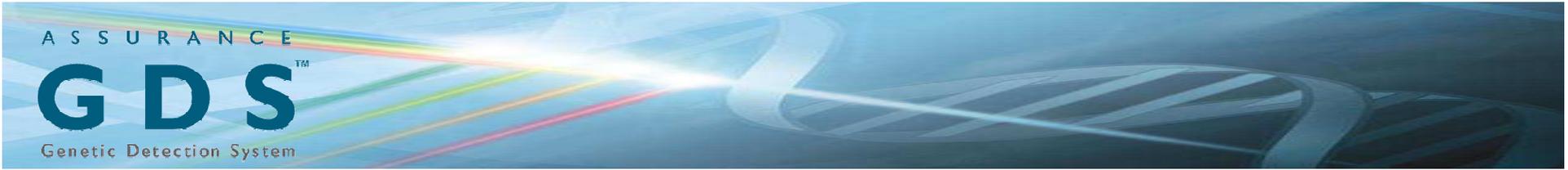


Recupero biglie+target e trasferimento nei tubi di amplificazione e da qui in macchina.



Pannello kits Assurance GDS :

- *Salmonella*
- *Listeria spp*
- *L. monocytogenes*
- *Cronobacter*
- TOP 7 STEC / VTEC 
- *E.coli O157:H7*
- *Shiga Toxin Genes*



STEC - Definizione

(Shiga Toxigenic E. coli)

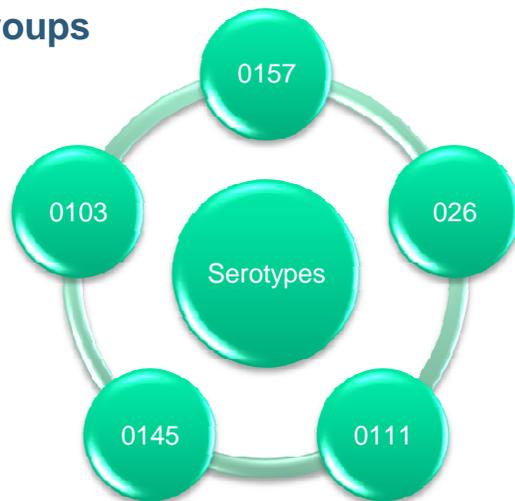
- ***STEC: E. coli*** Shiga Toxigenici – qualsiasi *E. coli* che possiede uno o entrambi i geni responsabili della produzione delle **Shiga Tossine stx_1 o stx_2**
- La **patogenicità** degli STEC è definita dalla presenza di un ulteriore gene: ***eae*** – responsabile della produzione di ***intimina***, molecola con funzione di riconoscimento e di adesione alle cellule intestinali dell'ospite

Definizione dei Top STEC

L'EFSA si riferisce ad una combinazione di sierogruppi O e geni chiave di patogenicità per definire i principali STEC di rilevanza per la salute pubblica.

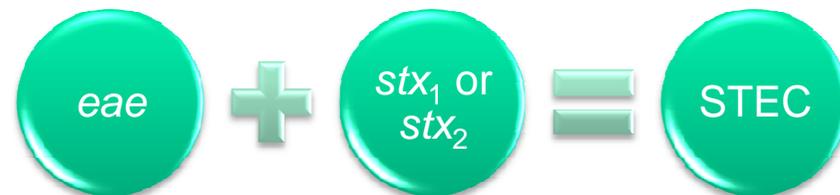
ISO13136 : Norma per la determinazione degli STEC

O Serogroups



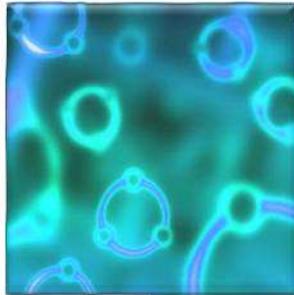
Immunological

Pathogenicity Genes



Genetic

Metodi Immunologici



EIA – Lateral Flow – ELFA

- La presenza di uno specifico sierogruppo non indica di per sé patogenicità ○
- La presenza di Shigatossine non dà informazione relativa alla tipologia di sierogruppo presente
- Alto tasso di falsi positivi

Metodi in PCR



PCR

- > 200 sierotipi di E.coli che possono contenere i geni target
- Molti non E.coli possono contenere i geni target
- Alto tasso di falsi positivi



Assurance GDS MPX Top 7 STEC

Arricchimento: 10-18 h @ 42°C in
mEHEC®

L'IMS concentra
i 7 sierogruppi target !!



Prep. campioni con IMS
O107, O103, O26, O145,
O111, O121, O45



Analisi PCR per
eae, stx1, stx2, e
E. coli O157:H7

Risultati in 12 ore



Assurance GDS Software

Open Save Stop Help | Arrange

Setup Analysis

Show results for: Top STEC MPX The run has completed. Report

E. coli O157:H7

eae

stx1/stx2

Internal Control

| No. | C | Name | Top STEC | eae Result | stx1 Result | stx2 Result | Assay | Kit Lot Number | Description |
|-----|---|------|----------|------------|-------------|-------------|--------------|----------------|-------------|
| 19 | | PC | Positive | + | + | + | Top STEC MPX | 4 | |
| 20 | | PC | Positive | + | + | + | Top STEC MPX | 4 | |
| 21 | | NC | Negative | - | - | - | Top STEC MPX | 4 | |
| 22 | | NC | Negative | - | - | - | Top STEC MPX | 4 | |
| 23 | | N/A | No Amp | - | - | - | Top STEC MPX | 4 | |
| 24 | | N/A | No Amp | - | - | - | Top STEC MPX | 4 | |

Page: Page 1

| | |
|----|-----|
| 1 | PC |
| 2 | PC |
| 3 | NC |
| 4 | NC |
| 5 | N/A |
| 6 | N/A |
| 7 | PC |
| 8 | PC |
| 9 | NC |
| 10 | NC |
| 11 | N/A |
| 12 | N/A |
| 13 | PC |
| 14 | PC |
| 15 | NC |
| 16 | NC |
| 17 | N/A |
| 18 | N/A |
| 19 | PC |
| 20 | PC |
| 21 | NC |
| 22 | NC |
| 23 | N/A |
| 24 | N/A |
| 25 | PC |
| 26 | PC |
| 27 | NC |
| 28 | NC |
| 29 | N/A |
| 30 | N/A |
| 31 | |
| 32 | |

All On All Off

Metodo ISO / EFSA

Arricchimento

mTSB + novob.
(Alimenti generale)

mTSB + Acrifl
(Latte e Derivati)

BPW per alimenti stressati

18 h @ 37°C

PCR per geni di
patogenicità

PCR
Screening per i geni

- *eae*
- *stx*₁
- *stx*₂

▪ Negativo – STOP

▪ Positivo – screening
per gli O sierogruppi

PCR per
O sierogruppi

PCR per i 5
sierogruppi:

- O157 *rfbE*
- O111 *wbdI*
- O26 *wzx*
- O145 *ihpI*
- O103 *wzx*

▪ Negative – STOP
▪ Positivo - Conferma

Metodo ISO / EFSA - CONFERMA

Isolamento

Arricchimento serogruppo specifico con utilizzo di IMS

Piastrare su TBX (per l'O26 RMAC)

PCR

Prelevare 10-50 colonie con morfologia *E.coli*

Trasferire su NA

Fare il pooling fino a 10 colonie in H₂O e testare per *stx*₁, *stx*₂ e *eae*

Se Positivo testare singolarmente le colonie

E.Coli e O gruppi

Confermare gli isolati via identificazione biochimica

Confermare gli O gruppi via agglutinazione o PCR

Vantaggi metodo BioControl

- Si restringe l'analisi ai sierogruppi d'interesse grazie all'IMS
- Si utilizza un unico terreno di arricchimento per tutte le matrici
- Prevede un'unica corsa in PCR multiplex
- Fornisce risultati in tempi minori
- Evita di dover confermare possibili falsi positivi provenienti dallo screening per i geni eae, stx1 e stx2
- Tutti i reagenti sono pronti all'uso

I VANTAGGI





GRAZIE PER L'ATTENZIONE !!