

**Secondo Workshop Annuale One Health del Laboratorio Nazionale di Riferimento per *E. coli*,
Istituto Superiore di Sanità, 11 Aprile 2025**

**Revisione del metodo ISO TS 13136: 2012 e
studi di validazione**

Rosangela Tozzoli



**Istituto Superiore di Sanità, Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Department,
European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli***



Nuova struttura della EN ISO 13136

Part 1



+ terreno di arricchimento (BPW)



Incubazione (+41,5°C)



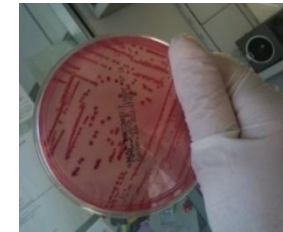
Real Time PCR per i geni *stx*



Se campione positivo per i geni *stx*:
Seminare la coltura di arricchimento su terreni solidi
(TBX + altri) per tentare l'isolamento di STEC
(50 colonie da saggiare)

I risultati positivi si riferiranno al
successo dell'isolamento:
STEC detected in XX g

Part 2



Caratterizzazione dei ceppi STEC isolati
stx genes subtyping
Detection of *eae* and *aggR*
STEC serogroup determination (top 5 +
O45 and O121)

La Revisione della ISO 13136 è stata in carico al gruppo di lavoro CEN TC463 WG2

Nel 2024, la ISO 13136-1 e -2 sono state sottoposte al DIS enquiry stage (Febbraio a Maggio 2024)

Entrambi i progetti sono stati approvati

ISO/DIS 13136-1

CEN level:

National Members Approving 14 Disapproving 4
77,778% Approvals

ISO level:

P-Members Approving 23 – Disapproving 5
85% Approvals

304 commenti ricevuti – 140 Editoriali

ISO/DIS 13136-2

CEN level:

National Members Approving 15 Disapproving 3
83,333% Approvals

ISO level:

P-Members Approving 24 – Disapproving 3
85% Approvals

262 commenti ricevuti – 160 Editoriali



**Istituto Superiore di Sanità, Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Department,
European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli***



**CEN TC463
Plenary
Meeting
Giugno 2024**

Decision 05/2024: *project EN ISO 13136 Microbiology of the food chain –Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) - Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of STEC
Part 2: Horizontal method for the characterization of STEC isolates*

CEN/TC 463 decides to transfer the lead from CEN to ISO to produce validation data by ILS.

CEN/TC 463 recommends ISO/TC 34/SC 9 to keep Rosangela Tozzoli as convenor of the future WG to be created at ISO/TC 34/SC 9 level, and as Project leader of projects EN ISO 13136-1&-2.

CEN/TC 463 asks the convenor to download the documents from WG 2 as “zip” files to the future WG at ISO/TC 34/SC 9 level.

CEN/TC 463 invites NSBs to nominate their current WG 2-experts within the future WG at SC 9 level.

CEN/TC 463/WG 2 is asked to keep working on the DIS-comments during the transition from CEN to ISO.

CEN/TC 463 invites ISO/TC 34/SC 9 to consider an intermediate “pre-FDIS” step regarding projects EN ISO 13136-1&-2.

CEN/TC 463 asks WG 2 to consider the conditions of use of patented primers and probes in Annex D.

ISO TC34 SC9 WG38 creato a Luglio 2024

Convenor: Rosangela Tozzoli

Convenor supporting team: Matthias Fischer

35 esperti (la maggior parte dei quali già in CEN TC463 WG2)

Due meeting organizzati con lo scopo di rispondere ai commenti ricevuti in sede di DIS enquiry

**2 Ottobre 2024 – evento online e in persona
24 esperti**

**17 Dicembre 2024 – evento online
20 esperti**



**Istituto Superiore di Sanità, Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Department,
European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli***



WG38 consultation on the reagents for *stx* detection

Nel Corso del primo meeting del WG38 gli esperti hanno discusso sull'opportunità di cambiare I reagent per l'identificazione dei geni *stx* indicati nella ISO 13136 Part 1, tenendo conto del fatto che non sono in gradi di identificare diversi sottotipi di *stx2*, in particolare la *stx2f*

Un primo sondaggio tra gli esperti ha messo in evidenza il consenso a indicare I primers e probes descritto in letteratura da Pavlovic et al, 2010

NRL for E. coli Germany ha usato questi reagenti per molto tempo in quanto sono indicate nel Metodo Ufficiale applicato a livello Nazionale (German method §64 LFGB L25.00-6, official method collection for state laboratories, for the detection of STEC in foodstuff) ed ha messo a disposizione dati di performance

A Novembre 2024 è stato lanciato un ballottaggio interno del WG38
Pe raccogliere l'opinione degli esperti sull'opportunità di sostituire i reagenti per la identificazione dei geni *stx*



Risultati della consultazione del WG38 riguardo ai primers e probes per *stx* nella ISO 13136-1

Votes cast: 20

Votes not cast: 17

Q1: "Are you in favour of replacing the primers and probes for *stx* described in Perelle et al. 2004 (currently indicated in the ISO TS 13136:2012) with those described in Pavlovic et al 2010?" **17 Yes 3 No**

Q2: "Are you in favour of having the Annex describing the primers and probes for *stx* detection as:" **13 Normative 7 Informative**

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume 7, Number 7, 2010
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2009.0457

I primers e probe per la identificazione dei geni *stx* saranno quelli
descritti da Pavlovic et al, 2010

Un documento a supporto per una risoluzione a livello SC9 preparato e
la risoluzione accolta

Development of a Multiplex Real-Time Polymerase
Chain Reaction for Simultaneous Detection
of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
and Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains

Melanie Pavlovic,¹ Ingrid Huber,¹ Henrike Skala,¹ Regina Konrad,¹
Herbert Schmidt,² Andreas Sing,¹ and Ulrich Busch¹



**Istituto Superiore di Sanità, Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Department,
European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli***



Sulla base della discussione nel corso dei meeting del WG38, tutte le richieste sollevate durante il DIS enquiry sono state considerate e sono stati preparati i documenti ISO 13136-1 and ISO 13136-2 modificati ove opportuno. I documenti sono stati inviati al SC9 per una consultazione pre-FDIS lanciata a fine Febbraio 2025 con durata di sei settimane.



Per la pubblicazione di metodi standard è prevista la raccolta di dati di validazione mediante studi inter-laboratorio (ILS)

Design of the Inter-laboratory Studies – preparato dal CEN TC463 WG2

Il disegno degli ILS è stato preparato e inviato al joint subgroup of WG 2 “Statistics” and WG 3 “Method validation”

Per ora un unico candidato per
organizzare lo studio su carne
macinata

ISO 13136 Part 1
Carne macinata,
Latte crudo,
Farina,
Vegetali a foglia,
Salsicce fermentate

25 g
test portion

Contaminate con ceppi STEC isolate dalle matrici specifiche

ISO 13136 Part 2, gli studi riguarderanno I moduli di
caratterizzazione descritti nel metodo:

- *stx* genes subtyping,
- *eae* and *aggR* determination,
- identification of a set of serogroups

Prossimi passaggi:

Attendere il risultato della votazione pre-FDIS

Sulla base del risultato raggiunto procedere con la valutazione finale FDIS

Rispondere ad eventuali nuovi commenti FDIS per avere i documenti ISO 13136-1 e ISO 13136-2 consolidati da sottoporre a studi di validazione

Richiedere che i due progetti vengano sottoposti ad un periodo di attesa per effettuare gli ILS

Richiedere al ISO/TC 34/SC 9 di lanciare una nuova call per arruolare organizzatori e partecipanti agli ILS (lo studio sulla carne macinata potrebbe avere luogo già a fine 2025)



Thank
you!

