



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

Edizione/ Rev.	In vigore il: RAQ-SP	Redazione RSA-2-BM	Verifica RSA-2-BM sost. RAF-BM sost.	Approvazione DR-ZA
00/0	Renata Borroni 14.01.2015	R. Tozzoli	S. Morabito L. Morelli	A. Caprioli
01/0	Renata Borroni 03.11.2017	R. Tozzoli	A. Maugliani L. Morelli	UDA-BM S. Morabito
01/1	12.07.2019 A.L. re		RSA-2-BM sost. RAF-BM sost. 	

Descrizione delle
modifiche:

In tutto il documento: correzione dei refusi; Par. 2: aggiornamento dei riferimenti

Copia controllata n° _____

Copia non controllata



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE	3
2. RIFERIMENTI	3
3. DEFINIZIONI	4
4. ABBREVIAZIONI	4
5. RESPONSABILITÀ	5
6. DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA E MODALITÀ OPERATIVE:	5
6.1 Preparazione del campione	5
6.2 Agglutinazione su vetrino (batteri vivi)	5
6.3 Agglutinazione su vetrino (batteri uccisi al calore)	6
6.4 Attrezzature ed apparecchiature	6
6.5 Reagenti e terreni	6
6.6 Sicurezza e d.p.i.	7
6.7 Ceppi di riferimento	7
6.8 Interpretazione dei risultati	7
6.9 Controllo degli antisieri	7
6.10 Controllo di qualità interno	8
6.11 Riesame della validazione	8
7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA	8
8. DESTINATARI	8
Appendice 1 Preparazione dei reagenti e dei terreni	10



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

La sierotipizzazione dei ceppi di *Escherichia coli* patogeni viene eseguita per identificare l'antigene somatico "O" che caratterizza il sierogruppo. Il presente metodo si applica ai ceppi **isolati** di *E. coli* produttori di verocitotossina isolati dall'EURL/LNR VTEC o inviati allo stesso per la caratterizzazione.

La determinazione del sierogruppo viene effettuata per agglutinazione rapida su vetrino e limitatamente ai sierogruppi più frequentemente associati a infezioni gravi nell'uomo: O157, O26, O103, O111 e O145.

2. RIFERIMENTI

- ISO 6887- Microbiology of food and animal feeding stuff - General guidance for the preparation of test samples, initial suspension and dilutions for microbiological examinations.
- ISO 7218 - Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations.
- D.L.vo 120/92, principi OCSE sulle Buone Pratiche di Laboratorio
- Decreto Legislativo 3 agosto 2009, n. 106 Disposizioni integrative e correttive del decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81 (**e successive modifiche ed integrazioni**), in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. (09G0119) (GU n. 180 del 5-8-2009 - Suppl. Ordinario n. 142)
- Orskov, F. and Orskov I. 1984. "Serotyping of *Escherichia coli*," in *Methods in Microbiology* Vol. 14 ed. Bergan T., editor. (London: Academic Press;) 43–112.
- POVDBM02 "Validazione dei metodi di prova - Microbiologia"
- POMRBM01 "Materiali riferimento"
- PGCPSP01 "Gestione campione e pratiche"
- **ISO 11133 "Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media"- ISO 11133:2014/Amd.1:2018**
- **PGGDSP01 "Gestione della documentazione"**
- **PGRMSP01 "Redazione metodi di prova"**
- **PGGASP01 "Gestione delle apparecchiature"**
- **PGVDSP01 "Validazione metodi di prova"**



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011	Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di <i>Escherichia coli</i> produttori di verocitotossina	REV. 1
---------------	--	--------

3. DEFINIZIONI

I sierogruppi o antigeni "O" di *E. coli* sono codificati da un numero compreso da 1 a 183. La lista dei sierogruppi è in continua evoluzione. I ceppi batterici che non corrispondono ad alcun sierogruppo noto vengono indicati con O?

ID campione: codice identificativo del campione, come codificato dalla procedura "Gestione campione e pratiche" PGCPSP01.

4. ABBREVIAZIONI

AL	Alimento
AQ	Acqua
BM	Biologia molecolare e Microbiologia (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)
CB	Colture Batteriche
DD	Direttore di Dipartimento
DR	Direttore del Reparto
EURL	Laboratorio di Riferimento Europeo
FE	Feci
ISS	Istituto Superiore di Sanità
LNR	Laboratorio di Riferimento Nazionale
LPS	Lipopolisaccaride
PTP	Personale tecnico abilitato all'esecuzione di attività di prova
RAF	Referente Area Funzionale
RAQ	Responsabile Assicurazione Qualità
RSA-2	Responsabile Settore Analitico LNR/ EU-RL <i>E. coli</i>
SA	Sangue
SGQ	Sistema gestione della qualità
SP	Dipartimento "Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria"; solo nella codifica dei documenti e nella codifica delle funzioni
TA	Tampone
TSA	Tryptone Soya Agar
TSB	Tryptone soy broth
UR	Urina
VT	Verocitotossina
VT1	Verocitotossina di tipo I
VT2	Verocitotossina di tipo II
VTEC	<i>E. coli</i> produttori di Verocitotossina



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

SM

Reparto Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare – One Health MTA (abbreviazione utilizzata nella codifica dei documenti e nelle sigle relative alle funzioni)

5. RESPONSABILITÀ

L'esecuzione del presente metodo, la verifica dell'idoneità del campione, la registrazione delle operazioni e dei dati grezzi è responsabilità del PTP. Mentre la responsabilità della convalida dei risultati, delle osservazioni e dei calcoli è dell'RSA-2-BM e del DR-SM.

E' responsabilità del RAF-BM garantire in particolare che i flussi dei processi che rientrano nell'ambito di applicazione del SGQ siano conformi alla presente procedura.

6. DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA E MODALITÀ OPERATIVE

Il metodo è basato sul principio dell'agglutinazione. In presenza di antisieri che riconoscano l'LPS batterico i ceppi vengono legati tra loro formando un aggregato visibile (agglutinazione). L'agglutinazione viene eseguita su vetrino (slide agglutination).

6.1 Preparazione del campione

- Criteri di conformità dei campioni

La verifica di conformità dei campioni viene effettuata al momento dell'apertura del conferimento come indicato nella Procedura generale "Gestione campioni e pratiche" PGCPSP01.

Nel caso di campioni refrigerati, la temperatura, rilevata all'interno del contenitore con termometro certificato, deve essere compresa tra +2.0°C e +8.0°C. Per i campioni congelati, la presenza del ghiaccio secco o siberini congelati nel contenitore, insieme alla verifica dello stato solido del campione, è un'indicazione sufficiente per determinarne la conformità. I campioni di prova spediti a temperatura ambiente non sono sottoposti al controllo della temperatura.

I campioni non conformi per i requisiti sopra citati sono comunque sottoposti ad analisi, e nei casi in cui la rilevanza epidemiologica dell'evento a cui sono associati, lo richieda.

- Tipologia dei campioni

Il campione può essere costituito da ceppi di *E. coli* isolati dall'EURL/LNR VTEC (tramite quanto descritto nel metodo LNRVTEC09 o POME46) o da altri laboratori e inviati all'EURL-VTEC per la caratterizzazione.

I ceppi sono seminati su terreno agarizzato (TSA) al fine di essere immessi nel flusso delle operazioni descritte nei paragrafi 6.2 e 6.3. Di seguito sono indicate le modalità di semina dei



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E

SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA

AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

ceppi pervenuti all'EURL-VTEC per la caratterizzazione a seconda dei terreni di coltura in cui vengono conferiti al laboratorio.

Infissioni in agar molle, strisci su piastre di terreni vari o "becchi di clarino".

Prelevare il campione in asepsi con un'ansa da 1 μ l e seminarlo ad isolamento direttamente su terreno agarizzato (TSA). Incubare le piastre a 37 ± 1 °C per 18-24 h.

Sospensioni in "Criobanks" o altri crio-preservanti.

Prelevare in asepsi una perlina dalla provetta utilizzando un ago da infissione sterile e inoculare in 2 ml di terreno nutriente (TSB) in tubo per batteriologia. L'inoculo è incubato a 37 ± 1 °C per 18-24 h. In seguito all'incubazione 10 μ l del brodo di arricchimento vengono seminati su terreno agarizzato (TSA). Le piastre sono poi incubate a 37 ± 1 °C per 18-24 h.

6.2 Agglutinazione su vetrino (batteri vivi).

Depositare su un vetrino portaoggetti una goccia di antisiero specifico per il pool di antigeni O (pool 1: anti- O157, O111, O103, O26, O145) di *E. coli* pronto all'uso.

Prelevare con un'ansa sterile una piccola quantità di batteri dalla piastra di coltura precedentemente preparata (6.1).

Stemperare sul vetrino portaoggetti contenente la goccia di antisiero pronto all'uso la patina batterica scaricando l'eccesso di batteri su un angolo del vetrino ed allargando la goccia di siero con l'ansa fino a comprendere lo scarico dei batteri.

Continuare a stemperare finché non si formi l'agglutinazione sotto forma di una precipitazione fine dispersa (due minuti sono sufficienti).

Verificare la presenza di agglutinazione.

In caso di agglutinazione positiva, procedere all'agglutinazione con i singoli antisieri specifici componenti il pool.

Agglutinare il ceppo da identificare anche con soluzione fisiologica al posto dell'antisiero per identificare eventuali ceppi autoagglutinanti.

6.3 Agglutinazione su vetrino (batteri uccisi al calore).

Per eseguire il saggio, occorre preparare l'antigene trattando la coltura batterica al calore secondo la seguente procedura:

Prelevare con un'ansa sterile una quantità di batteri corrispondente alla metà della piastra di semina del ceppo isolato (6.1).

Sospendere in 9ml di soluzione fisiologica.

Bollire la sospensione per un'ora.

Aggiungere formaldeide alla concentrazione finale di 0,3 %. Procedere come sopra utilizzando 25 μ l di sospensione batterica e una goccia dell'antisiero pronto all'uso che aveva dato reazione positiva con i batteri vivi.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

Verificare la presenza di agglutinazione.

Agglutinare il ceppo da identificare con soluzione fisiologica al posto dell'antisiero nelle stesse condizioni per identificare eventuali ceppi autoagglutinanti.

6.4 Attrezzature ed apparecchiature

- Cappa a flusso laminare
- Anse da batteriologia monouso da 1 e 10 μ l
- Pipettatrici automatiche a volume variabile (P10, P20, P100, P200, P1000)
- Puntali sterili
- Vetrini portaoggetti per microscopio
- Siringhe da 1 e 2 ml
- Filtri da 0,22 micron
- Provette tappo a scatto da 15 ml
- Tubi Falcon da 50 ml
- Piastra riscaldante
- Becker in pyrex da 1000 ml
- Incubatore a 37 ± 1 °C
- Frigorifero + 4 °C

6.5 Reagenti e terreni

Per la preparazione dei terreni e dei reagenti si rimanda all'Appendice 1.

- Tryptone Soya Agar (TSA) e Tryptone Soya Broth (TSB)
- Soluzione fisiologica
- Sieri di riferimento "Statensserum institut" pronti all'uso in pool.
- Sieri di riferimento "Statensserum institut" pronti all'uso singoli.

6.6 Sicurezza e d.p.i.

Alcuni stipiti di *E. coli* inducono gravi patologie nell'uomo, hanno una dose infettante molto bassa e sono segnalati casi di infezione contratta in laboratorio; è perciò necessario il rigoroso rispetto delle buone pratiche di laboratorio e l'utilizzo dei D.P.I. in dotazione al reparto in tutte le fasi della procedura.

Inoltre gli isolati di *E. coli* produttori di verocitotossina sono inseriti nell'allegato XLVI del D.Lgs. 9 Aprile 2008, n. 81 - Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro (aggiornato settembre 2010- come patogeni appartenenti alla classe di rischio 3**, pertanto nel manipolare colture pure è raccomandato l'uso dei dispositivi di contenimento previsti dall'allegato XLVII della suindicata normativa e di protezione individuali quali camice e guanti in lattice monouso.



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

6.7 Ceppi di riferimento

I ceppi di riferimento per i relativi sierogruppi sono:

C1188-02 Sierogrupo O26

C210-03 Sierogrupo O157

MM1302 Sierogrupo O111

C125-06 Sierogrupo O103

C1178-04 Sierogrupo O145

I ceppi di riferimento sono gestiti in qualità secondo quanto specificato nella **POMRBM01**, "Materiali riferimento".

6.8 Interpretazione dei risultati

Osservare l'eventuale comparsa di agglutinazione utilizzando una adeguata fonte di luce; l'avvenuta agglutinazione si riconosce per la rapida formazione di granuli fini o di aggregati più grossi; la reazione negativa è caratterizzata da una torbidità omogenea; una reazione debole o tardiva viene considerata negativa.

La metodica dell'agglutinazione su vetrino non è una metodica quantitativa per cui è possibile registrare solo la positività/negatività alla reazione di agglutinazione. Il risultato ed i riferimenti agli antisieri utilizzati per la sierotipizzazione sono riportati nel foglio di lavoro IOFLBM01.138n.

6.9 Controllo degli antisieri

Mensilmente viene effettuato il controllo degli antisieri procedendo all'agglutinazione dei ceppi di riferimento corrispondenti. Gli stipiti batterici utilizzati sono quelli indicati nella sezione 6.6 e il controllo viene registrato utilizzando il foglio di lavoro IOFLBM01.139n. In caso di non conformità al risultato atteso, i lotti di antisiero in uso vengono sostituiti con un nuovo lotto e ripetute le analisi ove possibile. I rapporti di prova emessi nel mese precedente vengono ritirati e sostituiti da nuovi rapporti di prova in seguito ad accordo col cliente sulla eventuale ripetizione della prova. In quest'ultimo caso viene aperta una non conformità in accordo a quanto descritto nella PGNCSP01.

6.10 Controllo di qualità interno

I risultati dei controlli mensili degli antisieri sono riportati nella Carta di controllo di qualità interno per i metodi qualitativi (POQMSP01.11n), al fine di determinare il trend dei risultati del laboratorio ed intraprendere, se necessario, azioni preventive per consentire il miglioramento delle performances. Le carte di controllo riportano i risultati dei controlli in ordinata e in ascissa il riferimento o la data di applicazione del metodo. I punti sul grafico esprimono il corretto o errato risultato del controllo positivo (+1 e -1 rispettivamente).



DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA

LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali sierogruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

6.11 Riesame della validazione

Annualmente il laboratorio procede ad un riesame della validazione dei metodi di prova, secondo quanto prescritto dalla procedura generale "Validazione metodi di prova" PGVDSP01. A tale scopo possono essere utilizzati i dati ottenuti, ad ogni sessione analitica, sui campioni definiti idonei come materiale di riferimento e/o sui campioni dei proficiency test. I parametri delle prestazioni del metodo, per i quali verificare il soddisfacimento dei requisiti, sono rappresentati da sensibilità, specificità, accuratezza e accordanza o ripetibilità. In caso di scostamento dei valori relativi ai parametri di prestazione del metodo ottenuti in sede di riesame rispetto ai requisiti specificati nei piani di validazione, la validazione deve essere ripetuta.

L'esito del riesame della validazione viene registrato utilizzando il modulo "Dichiarazione di idoneità" PGVDSP01.I2n.

7. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA

La copia originale della presente procedura è conservata presso l'archivio SGQ dipartimentale gestito dal RAQ-SP.

8. DESTINATARI

La procedura è distribuita in forma controllata dal RAQ-SP alle seguenti funzioni: DD-SP, RAF-BM, DR-SM, RSA-2-BM e a tutto il personale tecnico abilitato all'esecuzione di attività di prova.



LNRVTEC08.011

Identificazione mediante siero-agglutinazione dei principali siero gruppi patogeni di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina

REV. 1

Appendice 1

Preparazione dei reagenti e dei terreni:

TSA

Composizione

Digerito pancreatico di caseina	17.0 g
Digerito papainico di farina di soia	3.0g
D(+) glucosio	2.5 g
Sodio cloruro	5.0 g
K ₂ HP0 ₄	2.5 g
Agar	15 g
Acqua	1000 ml

Preparazione

Il terreno TSA viene acquistato pronto all'uso.

TSB

Composizione

Digerito pancreatico di caseina	17.0 g
Digerito papainico di farina di soia	3.0g
D(+) glucosio	2.5 g
Sodio cloruro	5.0 g
K ₂ HP0 ₄	2.5 g
Acqua	1000 ml

Preparazione

Il terreno TSB viene acquistato pronto all'uso.

SOLUZIONE FISIOLÓGICA

Composizione

NaCl	9 g
H ₂ O	1000 ml

Preparazione

La soluzione fisiologica viene acquistata pronta per l'uso, in compresse o preparata in Laboratorio secondo il protocollo seguente:

Sciogliere il sodio cloruro 800 ml di H₂O, portare a volume e sterilizzare per filtrazione con filtri da 0,22 micron. I flaconi sono etichettati e conservati a temperatura ambiente.