



RELATÓRIO

SHIGA TOXIN *Escherichia coli* (STEC) SCHEME

DISTRIBUIÇÃO Nº STX1 AMOSTRAS STX001 e STX002

Data do ensaio:	06 de junho 2016
Data limite de envio de resultados:	30 de junho 2016
Data do relatório:	10 de agosto 2016
Preparação de amostras e controlo da qualidade	Claire Jenkins, Frieda Jorgensen e Zak Prior
Dados analisados / Relatório elaborado:	Zak Prior
Relatório autorizado:	Nita Patel
Relatório traduzido, compilado e verificado:	Cristina Belo Correia e Isabel Campos Cunha
Consultores:	Claire Jenkins, Frieda Jorgensen e M ^a Margarida Saraiva

Este relatório não pode ser reproduzido sem a autorização dos responsáveis pelo Programa.

POR FAVOR VERIFIQUE NO RELATÓRIO SE O NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DO SEU LABORATÓRIO ESTÁ CORRETO

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DR. RICARDO JORGE, I.P.
Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
Microbiologia de Alimentos

Lab. Microbiologia de Alimentos
Av. Padre Cruz
1649-016 Lisboa
Telef. 21 7519230
Fax 21 7526470
e-mail: Cristina.Belo@insa.min-saude.pt

Lab. Microbiologia de Alimentos
Rua Alexandre Herculano, 321
4000-055 Porto
Telef. 22 3401132/33/00
Fax 22 3401189
e-mail: Isabel.Cunha@insa.min-saude.pt

FOOD EQA Schemes

Este Esquema disponibiliza amostras para avaliação externa da qualidade de laboratórios que analisam géneros alimentícios para pesquisa de *Shiga toxin Escherichia coli* (STEC) de acordo com a legislação europeia especificada no Regulamento (CE) N.º 2073/2005, relativo a Critérios Microbiológicos Aplicáveis aos Géneros Alimentícios, associado com o Regulamento (CE) N.º 852/2004, e subseqüentes alterações.

Controlo de Qualidade FEPTU: As amostras foram analisadas antes da distribuição em dois laboratórios da PHE. Foram analisadas 16 Lentículas® selecionadas aleatoriamente do lote utilizando dois métodos *real-time* PCR diferentes.

Se detetou algum problema nos ensaios, consulte a secção 17 do documento “A Guide to the use of the PHE Proficiency Testing Schemes for Food and Water Microbiology”, disponível em <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ApoioTecnico/PNAEQ/Paginas/MicrobiologiaAlimentos.aspx>

Lembramos que uma identificação incorreta ou incompleta de patogénicos em amostras de géneros alimentícios pode ter sérias implicações em saúde pública.

Contactos

INSA Dr. Ricardo Jorge

Cristina Belo Correia - Telef.: 21 7519230

e-mail Cristina.Belo@insa.min-saude.pt; Fax: 21 7526470

Isabel Campos Cunha – Telef.: 22 3401132/33/00

e-mail Isabel.Cunha@insa.min-saude.pt; Fax: 22 3401189

Acreditação: O PHE *Shiga Toxin Escherichia coli* (STEC) EQA Scheme encontra-se em processo de acreditação pelo *United Kingdom Accreditation Service* (UKAS) de acordo com a ISO/IEC 17043: 2010 - *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*.

Próxima distribuição:

As amostras da próxima distribuição do *Shiga Toxin Escherichia coli* (STEC) EQA Scheme serão enviadas na semana que se inicia a 9 de janeiro de 2017. Caso esteja interessado em participar agradecemos que contacte os organizadores.

Comentários adicionais:

Os organizadores gostariam de agradecer a todos os participantes que responderam ao questionário. Os dados fornecidos são de grande valor e serão utilizados para garantir que o desenho do esquema vai ao encontro das necessidades dos laboratórios.

Introdução

Enquadramento:

As *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) têm sido identificadas em todo o mundo como causa de doença gastrointestinal humana grave e do risco letal causado pelo Síndrome Hemolítico Urémico (SHU). O serotipo mais comumente implicado é o *E. coli* O157:H7, mas em vários países tem sido verificado um aumento da frequência de infeções envolvendo vários serotipos não-O157. Os surtos de toxinfecções alimentares causados por STEC podem afetar um grande número de pessoas e causar doença grave, tornando esta bactéria um dos mais importantes patogénicos emergentes ¹.

Como não está disponível um tratamento específico para a doença ²⁻³, há uma necessidade urgente de medidas preventivas eficazes que identifiquem os géneros alimentícios contaminados com STEC antes de serem colocados no mercado, assim como de uma compreensão detalhada da epidemiologia da infeção ⁴⁻⁵. Estas medidas estarão também dependentes da disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e simples para a deteção de patogénicos quer em amostras humanas quer em amostras de origem não humana, como os géneros alimentícios ⁶.

Incidência na União Europeia (UE):

Entre 2008 e 2012 foi registado um aumento estatisticamente significativo do número de casos de STEC reportados na UE, aproximadamente de 3000 para 6000 casos ⁷. Provavelmente isto deve-se à implementação de metodologias rápidas e ao aumento da consciencialização dos laboratórios de ensaio relativamente às estirpes de STEC não-O157, para além das STEC O157. Esta tendência teve um pico em 2011 devido à ocorrência de um surto de grandes dimensões.

Em 21 de maio de 2011, a Alemanha reportou um surto de STEC, serotipo O104:H4. Foram reportados ao *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) aproximadamente 3842 casos de doença causada por esta estirpe, 855 apresentando SHU, tendo sido declaradas 53 mortes. O consumo de sementes de feno-grego germinadas foi identificado como a origem mais provável ⁸.

Em 20 de outubro de 2011, a *European Food Safety Authority* (EFSA) adotou um parecer científico segundo o qual a contaminação de sementes secas com agentes patogénicos bacterianos, como os STEC, é a fonte de contaminação inicial mais provável dos surtos associados a rebentos ⁹.

Legislação:

O Regulamento (UE) N.º 209/2013 da Comissão altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 no que diz respeito aos critérios microbiológicos aplicáveis a rebentos incluindo a deteção de STEC. Estipula os critérios microbiológicos para os seis serogrupos que são reconhecidos como responsáveis pela maioria dos casos de SHU: O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4.

A legislação refere a Norma ISO/TS 13136: 2012ⁱⁱⁱ como o método analítico que deve ser seguido. Além das considerações relativas aos seis serogrupos, chama ainda à atenção para o facto dos microrganismos que têm um elevado potencial patogénico para os seres humanos geralmente evidenciarem a presença dos fatores de virulência: Shiga toxinas (*stx1* e/ou *stx2*) e adesina intimina (*eae*).

Referências:

1. Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *Journal of Infectious Diseases*. 2004 Feb 1;189 (3):355-9.
2. World Health Organization. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). World Health Organisation; 1998.

3. Grisaru S. Management of hemolytic-uremic syndrome in children. *International journal of nephrology and renovascular disease*. 2014; 7:231.
4. Behravesh CB, Williams IT, Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens and problems: expanding prevention efforts before slaughter or harvest. In: Institute of Medicine (US). *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2012. A14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114501/>
5. World Health Organization. *Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*. World Health Organization; 2008.
6. Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1999 Jul 31; 34 (3):229-43.
7. Bartels C, Beaute J, Fraser G, de Jong B, Urtaza JM, Nicols G. Annual epidemiological report 2014: food-and waterborne diseases and zoonoses. Stockholm: ECDC. 2014 Oct 10.
8. Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüssow H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4: a new challenge for microbiology. *Applied and environmental microbiology*. 2012 Jun 15;78(12):4065-73.
9. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2011. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. *EFSA Journal* 2011;9(11):2424, 101 pp. doi:10.2903/j.efsa.2011.2424

iii 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.

Resultados dos participantes

Participaram nesta distribuição 42 laboratórios e 39 enviaram resultados.

Total de amostras enviadas	42
Não analisadas	3

Exames pedidos: Pesquisa de STEC após processo de extração de DNA.

Amostra STX001

Conteúdo da amostra: *Escherichia coli* O157:H7 *stx* 2 e *eae* positivos (estirpe "selvagem" não viável).

Ensaio	Resultado esperado	Total de participantes que enviaram resultados	Nº de participantes que reportaram corretamente	Percentagem de resultados corretos
Pesquisa de <i>stx</i>	Detetada	35	34	97%
<i>stx</i> 1	Negativa	21	18	86%
<i>stx</i> 2	Positiva	30	28	93%
<i>stx</i> 1&2 (combinados)	Positiva	7	7	100%
<i>eae</i>	Positiva	35	35	100%
Identificação	<i>E. coli</i> O157	30	30	100%
Serologia	O157 (H7)	20 (10)	20 (10)	100%

Amostra STX002

Conteúdo da amostra: *Escherichia coli* O26:H11 *stx* 1 e *eae* positivos (estirpe "selvagem" não viável).

Ensaio	Resultado esperado	Total de participantes que enviaram resultados	Nº de participantes que reportaram corretamente	Percentagem de resultados corretos
Pesquisa de <i>stx</i>	Detetada	36	35	97%
<i>stx</i> 1	Positiva	37	36	97%
<i>stx</i> 2	Negativa	28	23	82%
<i>stx</i> 1&2 (combinados)	Positiva	7	7	100%
<i>eae</i>	Positiva	35	35	100%
Identificação	STEC não-O157	20	17	85%
Serologia	O26	22	20	91%

Comentários específicos da amostra e comentários gerais

Amostra STX001

A amostra continha *Escherichia coli* O157:H7 positiva para os genes *stx 2a*, *stx 2c* e *eae*; genes *lt*, *STh*, *STp* e *ipaH* negativos e era uma estirpe “selvagem” (*hlyA* não foi testado).

Esta estirpe foi utilizada na distribuição piloto nas amostras StxP2A & B na qual só 44% e 41% dos participantes, respetivamente, reportaram corretamente a deteção. Os resultados desta distribuição demonstram que não foi a estirpe que originou resultados baixos na deteção confirmando que isso se deve ao nível de STEC presente na amostra.

Amostra STX002

A amostra continha *Escherichia coli* O26:H11 positiva para os genes *stx 1a* e *eae*; genes *lt*, *STh*, *STp* e *ipaH* negativos e era uma estirpe “selvagem” (*hlyA* não foi testado).

Esta foi a primeira estirpe O26 isolada no Reino Unido.

Interpretação e fundamentação dos resultados

A interpretação dos resultados para as duas amostras está indicada na tabela seguinte:

Interpretação	Percentagem aproximada de participantes
Ausência de STEC na porção analisada	0%
Presença de STEC na porção analisada	34 – 36%
Presença de STEC potencialmente patogénicas para os humanos na porção analisada	17%
Presença de STEC altamente patogénicas para os humanos na porção analisada	12 – 17%
Outras / Interpretação própria do laboratório	31 – 36%

A designação “Outras” ou “Interpretação própria do laboratório” dos resultados deriva principalmente, no todo ou em parte, para as duas amostras - “Deteção presuntiva de *Escherichia coli* O157:H7/O26 produtora de shigatoxina e do gene *eae* de lesão A/E - *Attaching and Effacing* na porção analisada”, que está em concordância com a secção 10 da ISO/TS 13136: 2012.

A fundamentação para “Presença de STEC na porção analisada” é devida à presença dos genes *stx*.

A fundamentação para a “Presença de STEC potencialmente/altamente patogénicas para os humanos” e “Outras” / “Interpretação própria do laboratório” foi, no todo ou em parte – não foi possível efetuar isolamento cultural, mas verificou-se a deteção de STEC, O157:H7 / O26 e dos genes *stx* e *eae*.

A não conformidade das amostras com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos para géneros alimentícios (conforme alteração ^{iv}) só seria aplicável se as amostras fossem rebentos ou sementes germinadas.

Está disponível, se solicitado, uma tabela que inclui as respostas detalhadas.

^{iv} Commission regulation (EU) No 209/2013 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and the sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat

Comentários gerais - métodos

Verificou-se uma grande diversidade nos métodos utilizados para examinar as amostras (para informações adicionais consulte por favor a secção do questionário neste relatório).

Os participantes deverão conhecer os limites de detecção do método que utilizam. Isto incluiria ter conhecimento acerca do impacto, por exemplo, que os volumes utilizados para o caldo de enriquecimento e extração de DNA, as proporções-dos reagentes, o número de ciclos, iriam ter nos resultados obtidos.

Relembrem-se os participantes que caso estejam a seguir a norma ISO/TS 13136: 2012^v, a detecção do gene *eae* é um importante fator de virulência além da detecção do gene *stx*, para a interpretação dos resultados. Nesta distribuição 8% (3/39) dos participantes com resultados positivos para *stx* não reportaram resultados para *eae*.

Este esquema pode não ser adequado para metodologias rápidas que não sejam baseadas em PCR. Os participantes deverão contactar os organizadores para confirmar a adequação.

Aquando do envio dos resultados, os participantes deverão fornecer a informação se o método utilizado permite distinguir entre *stx* 1 e *stx* 2.

Comentários gerais

Foi solicitado aos participantes que preenchessem o “Formulário de resultados” e que não apresentassem somente os seus próprios relatórios mas também as folhas de trabalho que incluíam dados de acompanhamento do processo. Os organizadores procederam à interpretação dos resultados, etapa que não faz parte do processo e pode conduzir a imprecisões.

Relembrem-se os participantes que caso não examinem um parâmetro específico deverão reportar o resultado como “Não examinado”.

Os participantes devem seguir o “Protocolo de instruções de reconstituição das amostras” e entrar em contato com os organizadores caso necessitem de algum esclarecimento adicional.

O laboratório da FEPTU está atualmente a investigar formas de desenvolver este esquema de modo a incluir a etapa de enriquecimento do processo de detecção para estar mais próximo das necessidades dos participantes.

^v 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

Summary of participants results STX001

(incorrect results are recorded in red)

Lab	Stx		Stx1		Stx2		eae		Identification		Serology			Platform
	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	<i>E.coli</i> O157	CT	Serogroup	CT	CT	
9	Positive	22.62	Not detected	UD	Detected	22.28	Detected	20.54	<i>E.coli</i> O157	20.33	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
14	Positive	25.40			Detected	25.29	Detected	23.96	<i>E.coli</i> O157	23.73	O157	H7	25.5, 25.32	Applied biosystems - Life Technologies
66	Positive				Detected	20.30	Detected	19.9			NA	NA	NA	AllColi from Microsynth.
67	Positive				Detected	22.31	Detected	21.01	<i>E.coli</i> O157	NA	NE	NE	NE	Biotecon
121			Not detected		Detected	30.5	Detected	27.6	<i>E.coli</i> O157	35.6	O157		34.2	Biorad
145	Positive	23.30	Not detected		Detected	23.7	Detected	20.9	<i>E.coli</i> O157	21.4				Unknown
153	Positive	26.90	Not detected		Detected	26.9	Detected	24.2	<i>E.coli</i> O157	25.9	O157		25.9	Pall life Sciences GeneDisc System
166	Positive	22.50					Detected	21.12 02	<i>E.coli</i> O157	20.49	NE	NA	NA	Applied biosystems - Life Technologies
243					Detected	19	Detected	17			NE	NE	NE	Primer Design
266	Positive	20.92	Not detected	NA	Detected	21.62	Detected	20.32	<i>E.coli</i> O157	18.13	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
270	Positive	22.23	Other: STX1/STX2			22.23	Detected	21.36			O157	H7	20.74	Biorad
293	Positive	24.80	Not detected		Detected	25.06	Detected	23.56	<i>E.coli</i> O157	23.08	O157	H7	24.2	Suretech
297	Positive		Not detected		Detected	20.49	Detected	20.87	NE	NE	NE	NE	NE	AllColi from Microsynth.
336	Positive	20.93	Not detected	NA	Detected	NA	Detected	19.63	<i>E.coli</i> O157	NA	NA	NA	NA	Unknown
345	Positive	NA			Detected	21.42	Detected	20.04	<i>E.coli</i> O157		O157	NE		Biotecon
379			Not detected	UD	Detected	26.5	Detected	24.42	<i>E.coli</i> O157 (gen rfbE)	25.08	O157		18.33	Applied biosystems - Life Technologies
385	Positive		Not detected	NEG	Detected	19.96					O157		20.73	Unknown
511	Positive	24.43					Detected	28.43	<i>E.coli</i> O157	23.43	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
538	Positive	NA	Not detected	NA	Detected	27.16 27.12 27.17 26.77	Detected	25.06 25.14 25.45 26.12	<i>E.coli</i> O157	24.64 24.89 25.01 25.33	O157	H7	24.68 24.89 25.01 25.33	In house
566	Positive	25.42	Detected	19.8	Not detected				<i>E.coli</i> O157	19.8	O157		19.8	Biorad
576	Positive	22.2	Not detected	NEG	Detected	22.2	Detected	20.4	<i>E.coli</i> O157	21.2	O157		21.2	Unknown
641	Positive	23.1	Not detected	0	Detected	23.1	Detected	20.8	<i>E.coli</i> O157	22.8	O157	H7	26	Pall life Sciences GeneDisc System

Lab	Stx		Stx1		Stx2		eae		Identification		Serology			Platform
	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	<i>E.coli</i> O157	CT	Serogroup	CT	CT	
677	Positive				Detected	21.02	Detected	20.21	<i>E.coli</i> O157	20.88	NE	NE	NE	Unknown
717	Negative		Negative		Negative									Unknown (Immunochromatography)
770	Positive				Detected	20.7	Detected	20.32	<i>E.coli</i> O157	24.5	O157	NE	24.5	Applied biosystems - Life Technologies & Jumpstart - Sigma-Aldrich
1093	Positive		Not detected		Detected	21.14	Detected	19.03	<i>E.coli</i> O157		O157	NE	NE	Biotecon
1212	Positive	24.14	Not detected		Detected	23.2	Detected	21.36			NE	NE	NE	Biorad
1237	Positive	21.33	Other: STX1/STX2				Detected	19.79	<i>E.coli</i> O157	18.6	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
1634			Detected	27.8	Detected	24.9	Detected	20.2			O157	H7	19.6	Applied biosystems - Life Technologies
1636	Positive	17.48			Detected	17.4	Detected	16.95	<i>E.coli</i> O157	NA				In-house
1753	Positive	22.9	Not detected	UD	Detected	24	Detected	21.2	<i>E.coli</i> O157	20.9	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
1838	Positive	23.86	Other: STX1/STX2			23.86	Detected	22.79	<i>E.coli</i> O157	24.34	O157	H7	24.34	Biorad
2274	Positive				Detected	19.04	Detected	18.51	<i>E.coli</i> O157	18.05				Biorad & Jumpstart - Sigma-Aldrich
2308	Positive		Detected	23.09	Detected	23.09	Detected	22.36	<i>E.coli</i> O157	21.01	O157	H7	21.01	Unknown
2309	Positive		Other: STX1/STX2			23.88	Detected	23.6						Unknown
2310	Positive	22	Not detected		Detected	22	Detected	21	<i>E.coli</i> O157	20	O157		20	Biorad
2312	Positive	24.85	Other: STX1/STX2			24.85	Detected	23.02	<i>E.coli</i> O157	22.99	O157	H7	25.82	Applied biosystems - Life Technologies
2313	Positive	33.54	Other: STX1/STX2			33.54	Detected	33.04	<i>E.coli</i> O157	33.55	O157	H7	33.55	Biorad
2314	Positive	24.5	Other: STX1/STX2			Pos			<i>E.coli</i> O157	23.2	NE	NE	NE	Biotecon & Congen

NE: Not examined
NA: Not applicable
UD: Undetectable
Pos: Positive

Summary of participants results for STX002

(incorrect results are recorded in red)

Lab	Stx		Stx1		Stx2		eae		Identification		Serology			Platform
	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	<i>E.coli</i> O157	CT	Serogroup	CT	CT	
9	Positive	22.93	Detected	21.07	Not detected	UD	Detected	20.49	Not O157	UD	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
14	Positive	22.27	Detected	21.14			Detected	21.25	STEC non-O157		O26		20.92	Applied biosystems - Life Technologies
66	Positive		Detected	22.9			Detected	22.6						AllColi from Microsynth.
67	Positive		Detected	22.15			Detected	20.64		NA	NE	NE	NE	Biotecon
121			Detected	29.5	Not detected		Detected	22.9	STEC non-O157	22.7	O26		22.7	Biorad
145	Positive	25.6	Detected	24.2	Not detected		Detected	23	STEC non-O157	yes	O26		24.4	Unknown
153	Positive	26.3	Detected	26.3	Not detected	NA	Detected	25.8	STEC non-O157	23.7	O26		23.7	Pall life Sciences GeneDisc System
166	Positive	22.57					Detected	20.99			NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
243			Detected	17			Detected	17			NE	NE	NE	Primer Design
266	Positive		Detected	20.57	Not detected	NA	Detected	19.2	STEC non-O157	NA				Applied biosystems - Life Technologies
270	Positive	22.66	Other: STX1/STX2			22.66	Detected	21.83			O26	NA	22.06	Biorad
293	Positive	19.32	Detected	18.56	Not detected		Detected	18.11						Suretech
297	Positive	NA	Detected	21.3	NE	NE	Detected	21.77	NE	NE	NE	NE	NE	AllColi from Microsynth.
336	Positive	20.86	Detected	NA	Not detected	NA	Detected	19.86	STEC non-O157	NA	O26		NA	Unknown
345	Positive		Detected	21.14			Detected	19.15	STEC non-O157		O26			Biotecon
379			Detected	22.22	Not detected	UD	Detected	21.01	<i>E.coli</i> O157 (gen rfbE)	UD	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
385	Positive		Detected	18.71	Not detected	NEG					O26		19.29	Unknown
511	Positive	22.87					Detected	22.94	STEC non-O157		NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
538	Positive	NA	Detected	25.60 25.53 24.27 24.32	Not detected		Detected	24.14 24.30 25.73 25.68	STEC non-O157	24.80 24.93 24.13 24.25	O26		24.86 24.93 24.13 24.25	In house
566	Positive	24.5	Detected	30.54	Detected	22.32			<i>E.coli</i> O157	30.54	O157 O26		30.54 22.32	Biorad
576	Positive		Detected	21.7	Detected	21.7	Detected	22	STEC non-O157		O26		22.3	Unknown

Lab	Stx		Stx1		Stx2		eae		Identification		Serology			Platform
	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	Detection	CT	<i>E.coli</i> O157	CT	Serogroup	CT	CT	
641	Positive	21.1	Detected	21.1	Not detected	0	Detected	20.6	<i>E.coli</i> O157	0	O26		23.2	Pall life Sciences GeneDisc System
677	Positive		Detected	20.6	Not detected		Detected	20.3			O26		20.32	Unknown
717	Negative		Negative		Negative									Unknown (Immunochromotography)
770	Positive		Detected	21.15			Detected		STEC non-O157	23.23	O26	NE	23.23	Applied biosystems - Life Technologies & Jumpstart - Sigma-Aldrich
1093	Positive		Detected	20.86	Detected	20.86	Detected	18.62	STEC non-O157		O26	NE		Biotecon
1212	Positive	26.13	Detected	26.02	Not detected		Detected	22.56			NE	NE	NE	Biorad
1237	Positive	20.56	Other: STX1/STX2			Pos	Detected	19.04	STEC non-O157	20.56	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
1634	Positive		Detected	29.5			Detected	21.3			O157	H7	35.2	Applied biosystems - Life Technologies
1636	Positive	17.19	Detected	17.9			Detected	17.25			NE	NE	NE	In-house
1753	Positive	20.6	Detected	19			Detected	19.5	<i>E.coli</i> O157	UD	NE	NE	NE	Applied biosystems - Life Technologies
1838	Positive	22.78	Other: STX1/STX2			22.78	Detected	22.55			O157 negative	H7	NE	Biorad
2274	Positive		Detected	20.28			Detected	18.75			O26		17.58	Biorad & Jumpstart - Sigma-Aldrich
2308	Positive		Detected	23.28			Detected	22.3	STEC non-O157	22.28	O26		22.28	Unknown
2309	Positive		Other: STX1/STX2			28.54	Detected	23.78						Unknown
2310	Positive	22	Detected	22			Detected	21	STEC non-O157	20	O26		20	Biorad
2312	Positive	20.32	Other: STX1/STX2			20.32	Detected	18.38	STEC non-O157		O157	H7	UD	Applied biosystems - Life Technologies
2313	Positive	30.11	Other: STX1/STX2			30.11	Detected	29.9			O26		31.86	Biorad
2314	Positive	24.9	Other: STX1/STX2			Pos					NE	NE	NE	Biotecon & Congen

NE: Not examined
NA: Not applicable
UD: Undetectable
Pos: Positive

Resultados do questionário

1. ISO/TS 13136:2012 ^{vi}

88% (30/34) dos laboratórios participantes seguem o método recomendado pela ISO.

2. *Primers*

Houve uma grande variação nos *primers* utilizados pelos participantes (Gráfico 1).

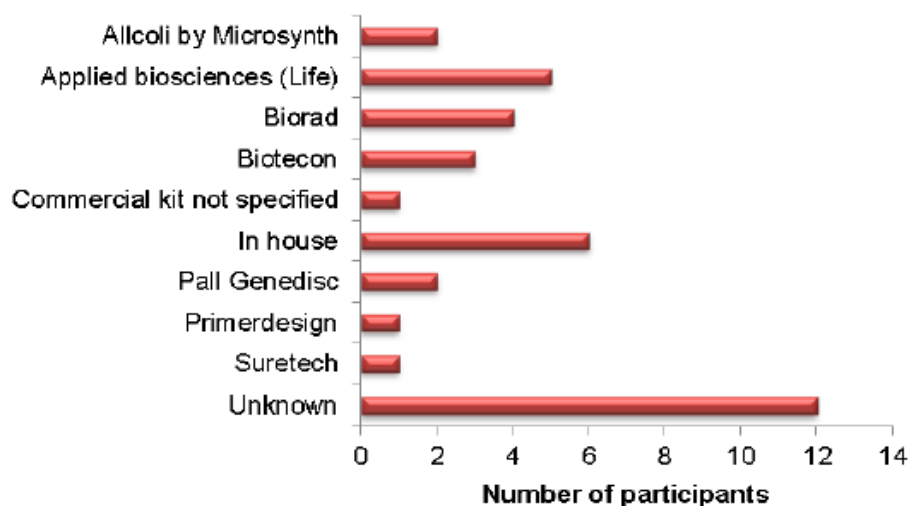


Chart 1: Primer kits used by participants

3. Processo de enriquecimento cultural

A maioria dos participantes utilizou BPW ou mTSB(n).

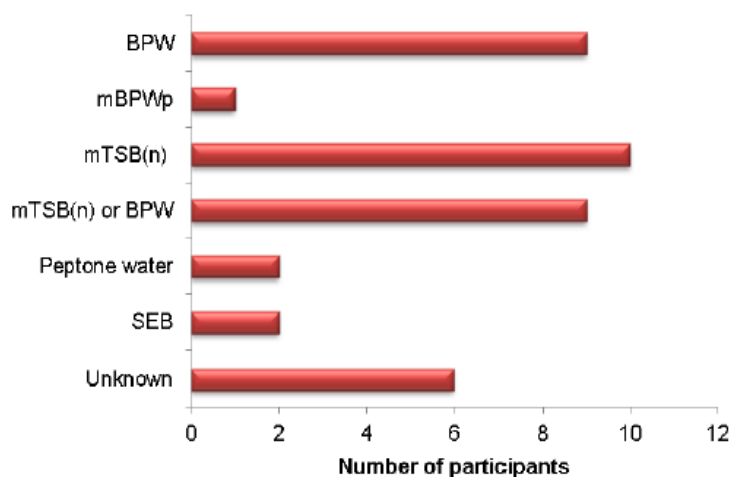


Chart 2: Culture enrichment process

BPW: Buffered peptone water, mBPWp: modified BPW with pyruvate, mTSB(n): modified tryptone soya broth with novobiocin, SEB: STEC enrichment broth.

^{vi} 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

4. Extração do DNA

A maioria dos participantes reportou a utilização de um *kit* comercial (Gráfico 3).

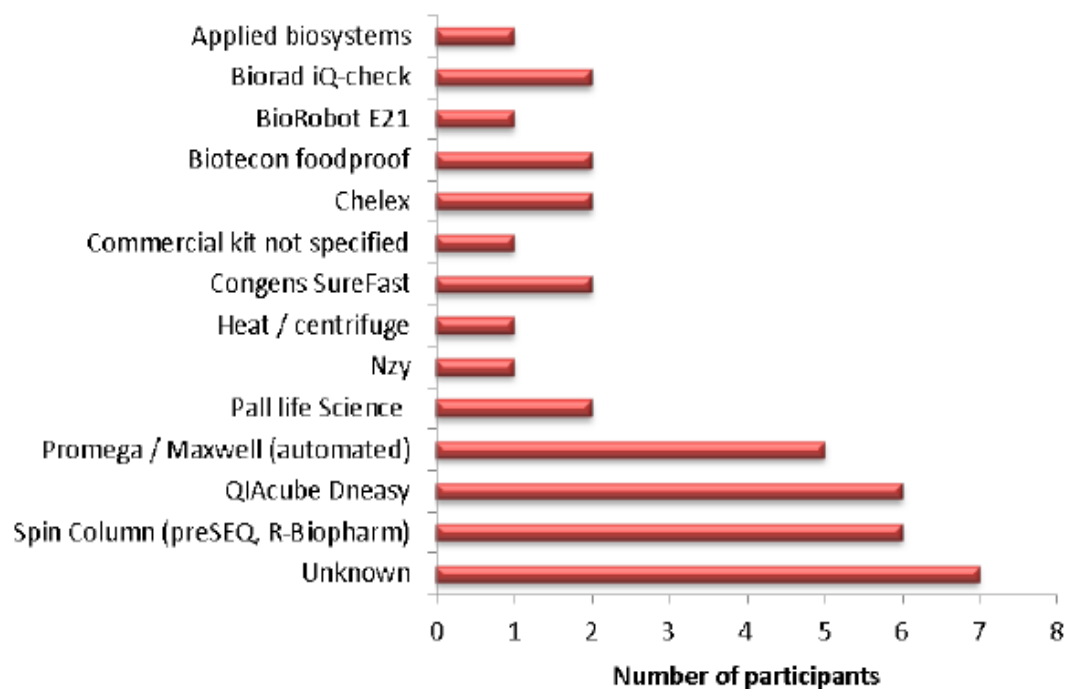


Chart 3: DNA extraction kits used by participants

5. Tipo de ensaio molecular e equipamento utilizado

Todos os participantes responderam a esta questão reportando o uso de *real-time* PCR ou PCR. Houve uma variação no equipamento utilizado para realizar o *real-time* PCR (Gráfico 4).

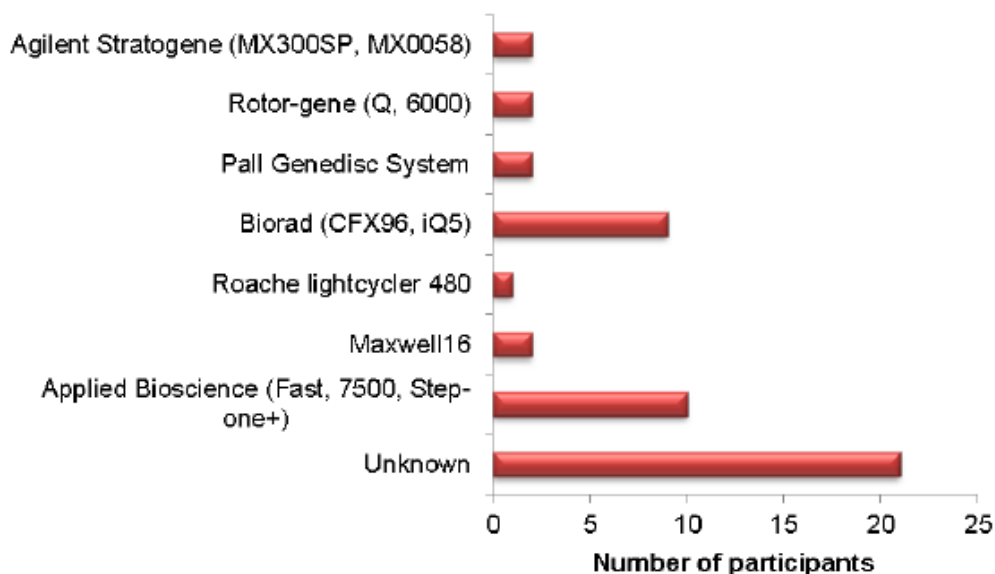


Chart 4: PCR equipment used by participants

6. Volume testado a partir da amostra de DNA extraído

Os participantes usaram entre 1-1000 μl do DNA extraído (Gráfico 5).

A maioria dos participantes utilizou 5 μl .

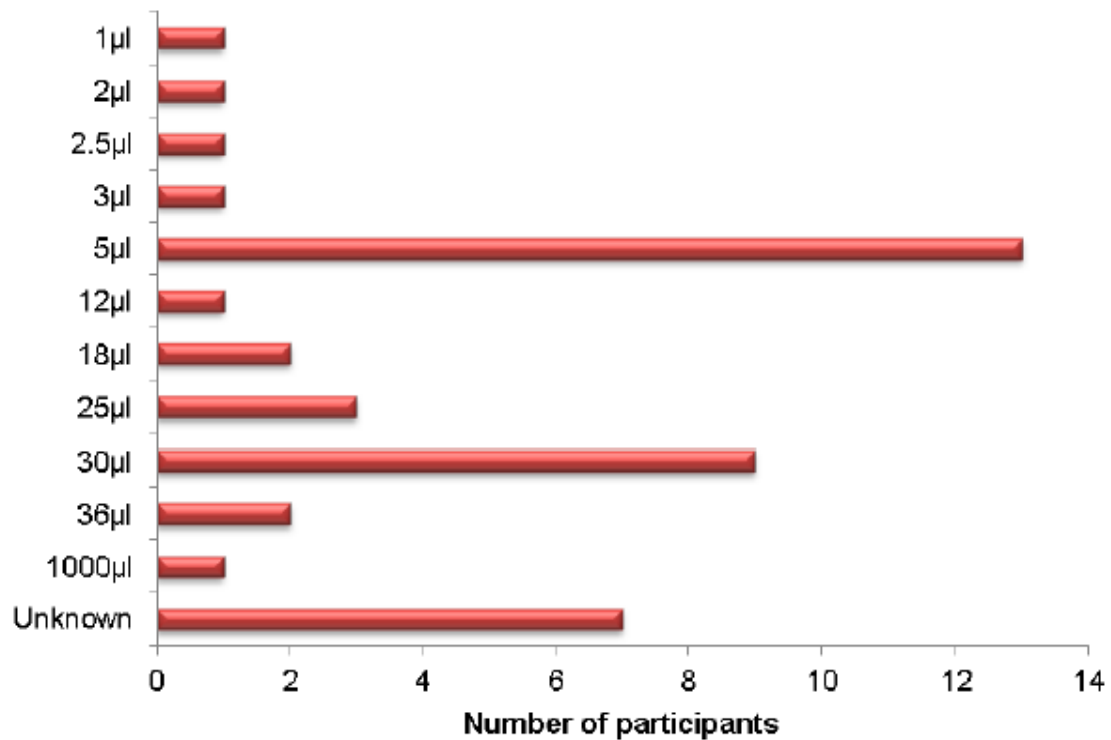


Chart 5: Volume of extracted DNA added to master mix by participants

7. Volume da master mix

O volume da *master mix* utilizado pelos participantes variou de “liofilizado” a “36 μl ” (Gráfico 6)

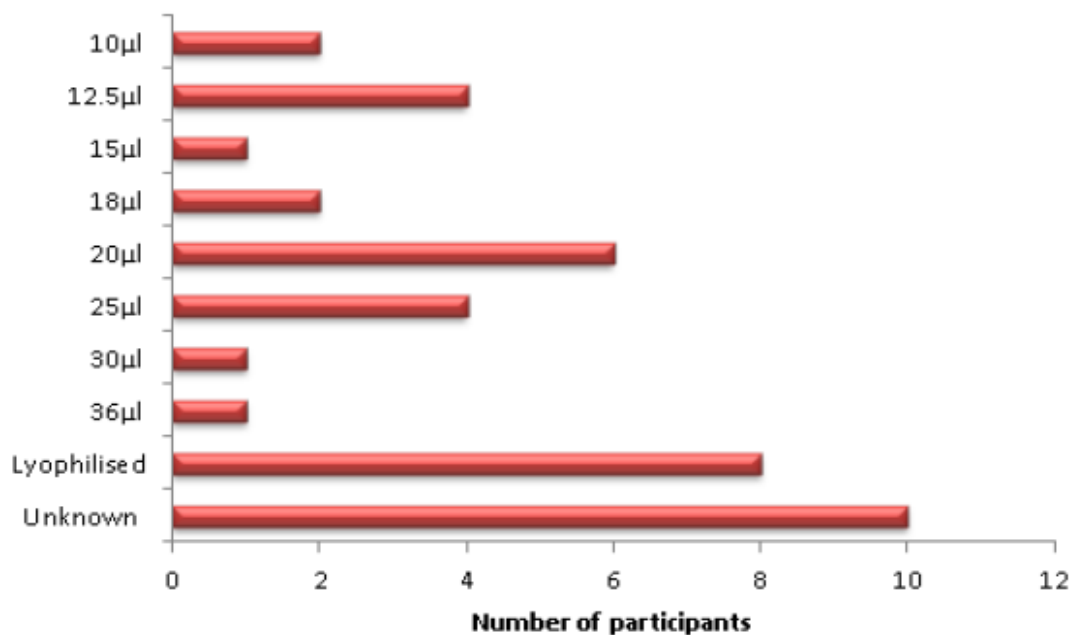


Chart 6: Master mix volume used by participants

8. Informação relativa aos ciclos de PCR

a) Pré-incubação

Cinco laboratórios participantes reportaram ter efetuado uma etapa de pré-incubação.

Dois, durante 4 minutos a 37 °C e três, durante dois minutos a 50 °C.

b) Temperatura e tempo de desnaturação

25/25 (100%) dos laboratórios participantes utilizaram uma temperatura de desnaturação de 95 °C (Gráfico 7).

Os tempos a estas temperaturas variaram entre 15 segundos e 15 minutos.

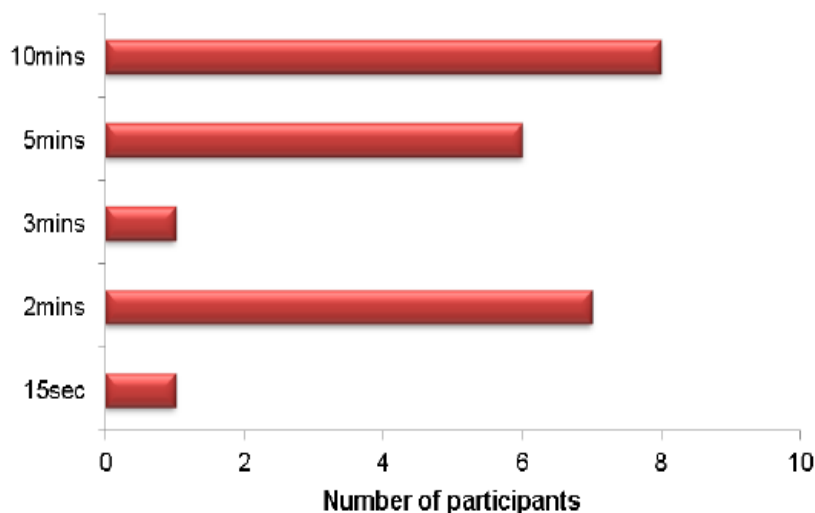


Chart 7: Denaturisation time used by participants at 95 °C

c) Ciclo de Annealing

O número de etapas de amplificação variou de 2-4 (ex. 30s a 60 °C, 15s a 72 °C e 30s a 94 °C, 30s a 55 °C, 60s a 72 °C, 120s a 72 °C).

Os ciclos destas etapas variaram de x30-x50 (Gráfico 8).

Os tempos variaram de 3-120 seg.

As temperaturas variaram de 40-95 °C.

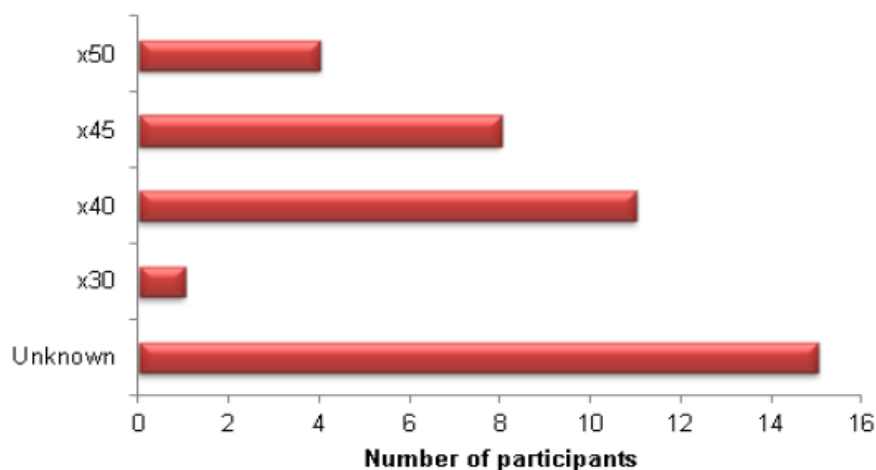


Chart 8: Number of RT-PCR cycles used by participants

d) Arrefecimento

Cinco participantes reportaram um tempo e temperatura de arrefecimento.

Três utilizaram 30 seg a 40 °C, um 2 mins a 40 °C e um indefinidamente a 4 °C.

Fim do relatório