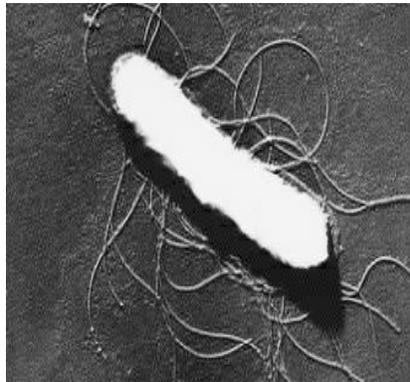


PT39

RISULTATI DEL 39° STUDIO INTER-LABORATORIO NAZIONALE (PT39) SULL'IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DI CEPPI DI *E. COLI* PRODUTTORI DI SHIGA-TOSSINA (STEC) IN FORMAGGIO - 2024



PAOLA CHIANI



Laboratorio Nazionale di Riferimento per E. coli Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare Istituto Superiore di Sanità

OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO



- migliorare la preparazione dei Laboratori coinvolti nel Controllo Ufficiale degli alimenti sull'analisi di campioni di questa matrice, per l'identificazione e isolamento di STEC secondo la norma ISO TS 13136:2012;
- evidenziare criticità e spazi di miglioramento nelle performance analitiche per la ricerca di STEC della rete dei laboratori che operano il controllo ufficiale degli alimenti;
- fornire un ulteriore supporto ai Laboratori Ufficiali per l'accreditamento della ISO TS 13136:2012.



Laboratorio Nazionale di Riferimento per E. coli Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare Istituto Superiore di Sanità

Lo studio è stato condotto nel Maggio 2024

L'invito agli NRL è stato mandato a Febbraio 2024

Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di identificare la presenza di STEC con il metodo ISO TS 13136:2012, utilizzando BPW come terreno di arricchimento eseguendo anche l'adattamento fornito dal LNR coli per il rilevamento di STEC O104:H4

PARTECIPANTI

26 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti

I Laboratori afferivano a diverse sedi di 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) (22 Laboratori), un'Agenzia di Tutela della Salute (ATS), un'Agenzia provinciale per l'ambiente e la tutela del clima (APPA), un'Agenzia provinciale per l'ambiente (ARPA) e all'azienda USL TC di Firenze.

La stabilità e l'omogeneità è stata valutata in accordo alla ISO 17043:2010

Contaminazione → 17 Maggio 2024
Spedizione → 20 Maggio 2024



Tutti i laboratori hanno ricevuto i campioni entro 24 ore

CAMPIONI

- 2 da 25g ciascuno

Contaminante (<i>Genotipo</i>)	Livello di contaminazione:	
	Sample 1	Sample 2
Ceppo C1188-02, STEC O26:H11 (<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>eae+</i>)	-	2 CFU/25 g

Due campioni costituiti da 25 g of formaggio potenzialmente contaminato da STEC, sono stati inviati ai Laboratori partecipanti.

Il formaggio è stato acquistato da un rivenditore locale e la presenza di microflora naturale è stata valutata mediante conta su piastre di TSA e MacConkey di diluizioni seriali di 25 gr di formaggio omogeneizzato in 225 ml di Acqua Peptonata

Non è stata osservata alcuna crescita su entrambi i terreni.

La stabilità è stata valutata utilizzando campioni contaminati il 13 febbraio 2024 e saggiati secondo quanto prescritto nel metodo ISO TS 13136:2012 dopo 0, 2, 6 e 9 giorni dalla contaminazione iniziale.

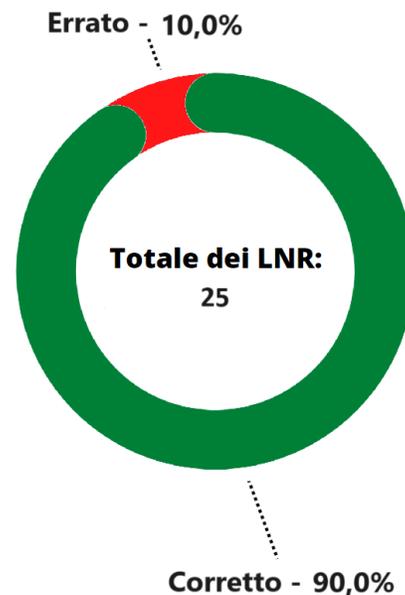
Lo screening in Real Time PCR e l'isolamento hanno avuto entrambi successo per tutti i campioni saggiati e in tutti i punti temporali.



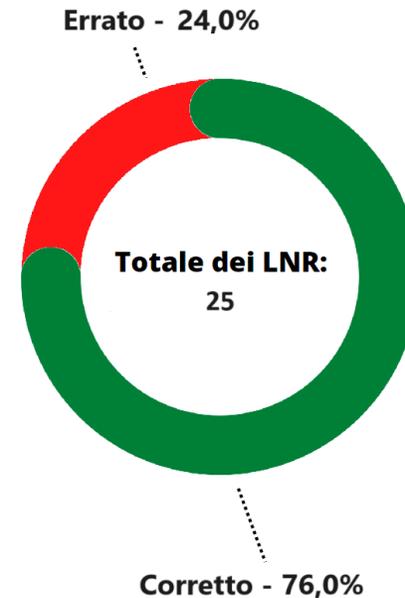
Laboratorio Nazionale di Riferimento per E. coli Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica
Veterinaria Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare Istituto Superiore di Sanità

RISULTATI-I

PERCENTUALE DI LABORATORI CHE HANNO RILEVATO CORRETTAMENTE I GENI NELLA FASE DI SCREENING (A) E ISOLATO IL CEPPO STEC (B) PRESENTE NEL CAMPIONE 2 (VERDE: RISULTATO CORRETTO; ROSSO: RISULTATO ERRATO, CHE COMPRENDE SIA IL MANCATO ISOLAMENTO CHE L'INCORRETTA CARATTERIZZAZIONE DEL CEPPO STEC ISOLATO). HANNO RIPORTATO I RISULTATI 25 LABORATORI



a. Screening



b. Isolamento



Risultati-II

Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogruppo nelle colture di arricchimento (i riquadri gialli rappresentano i gold standard; i riquadri verdi: risultati corretti e i riquadri rossi: risultati errati).

	Campione 1	Campione 2
Valore atteso	Campione negativo	<i>stx1; stx2; eae; O26</i>
L009		<i>stx1; stx2; eae</i>
L010		
L011		
L020		<i>stx1; stx2; eae; O103; O145</i>
L021		
L023		
L024		
L028		
L030		<i>stx1; stx2; eae</i>
L031		
L032		<i>stx1; stx2; eae</i>
L033		<i>stx1; stx2; eae</i>
L350		
L422		
L501		
L684		
L702		
L831		
L988		
L989		
L990		
L991		
L992		
L997		
L998		

RISULTATI-III

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DEL CEPPO STEC DAI CAMPIONI DI FORMAGGIO. (LE CASELLE GIALLE RAPPRESENTANO I GOLD STANDARD; LE CASELLE VERDI: RISULTATI CORRETTI E LE CASELLE ROSSE: RISULTATI ERRATI).

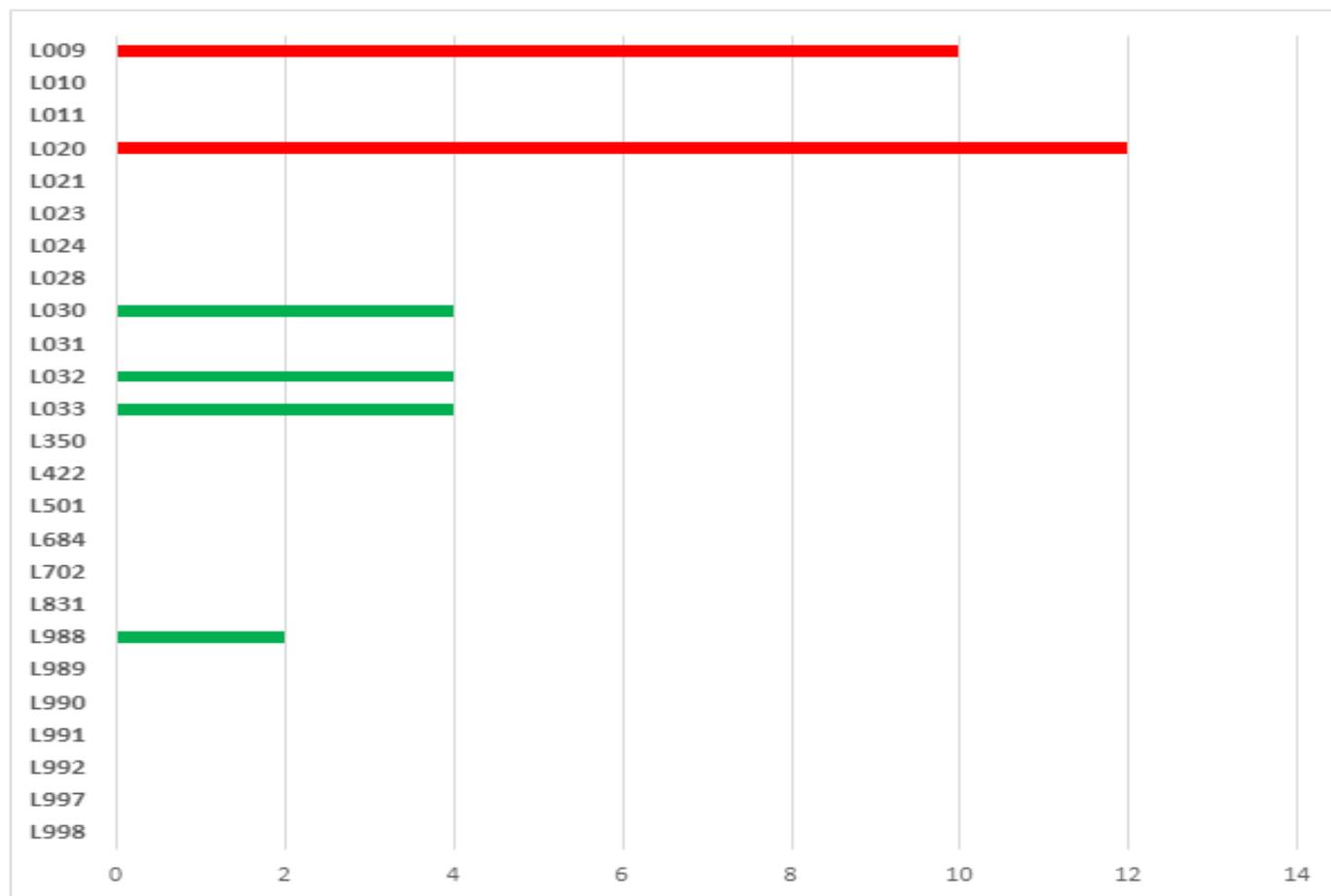
	Campione 1		Campione 2
Valore atteso	Isolamento non eseguito	Valore atteso	<i>stx1; stx2; eae; O26</i>
L009		L009	<i>stx1;stx2;eae;O26;O103;O111;O145;O157</i>
L010		L010	
L011		L011	
L020		L020	<i>stx1; stx2; eae; O103; O145</i>
L021		L021	
L023		L023	
L024		L024	
L028		L028	
L030		L030	<i>stx1; stx2; eae</i>
L031		L031	
L032		L032	isolamento non raggiunto
L033		L033	<i>stx1; stx2; eae</i>
L350		L350	
L422		L422	
L501		L501	
L684		L684	
L702		L702	
L831		L831	
L988		L988	isolamento non raggiunto
L989		L989	
L990		L990	
L991		L991	
L992		L992	
L997		L997	
L998		L998	

Raccolta ed elaborazione dei risultati

- I risultati sono stati raccolti attraverso un *form online* dedicato
- Ai partecipanti è stato richiesto di indicare nel *form* il proprio codice di laboratorio (Lab code), fornito in anticipo a ciascuno dei partecipanti, le informazioni sulla data di arrivo, la temperatura e lo stato dei campioni, nonché i risultati ottenuti per ciascun campione.
- I risultati riportati sono stati categorizzati assegnando dei punti di penalità
- Per la fase di screening sono stati assegnati **quattro** punti di penalità per ogni risultato errato o mancante relativo all'identificazione dei geni *stx1* e *stx2* e **due** punti di penalità per risultati non corretti relativamente all'identificazione del gene *eae* e dei geni associati ai cinque sierogruppi.
- **Due** punti di penalità in caso di mancato isolamento di STEC dal campione 2.
- Per quanto riguarda la caratterizzazione del ceppo, sono state attribuite **quattro** penalità per errata rilevazione dei geni codificanti Stx, **due** penalità per mancata identificazione del gene *eae* e **due** per l'identificazione di un sierogruppo diverso da quello del ceppo STEC utilizzato per contaminare il campione (O26).



VALUTAZIONE DELLA *PERFORMANCE* DEI LABORATORI NELLA FASE DI SCREENING E DI ISOLAMENTO.



La **somma dei punti di penalità** ottenuti nelle diverse fasi della procedura ha dato origine ad un punteggio totale, utilizzato per valutare la prestazione complessiva dei Laboratori partecipanti. La performance dei Laboratori che hanno ottenuto un punteggio superiore a **otto** è stata considerata insoddisfacente.

VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE DEL METODO

- Il calcolo di **Se e Sp nella fase di screening** ha restituito i seguenti risultati seguendo la seguente formula:

Sensibilità: $Se = [\text{veri positivi} / (\text{veri positivi} + \text{falsi negativi})] \times 100$
Specificità: $Sp = [\text{veri negativi} / (\text{veri negativi} + \text{falsi positivi})] \times 100$

Tabella 1. Sensibilità and Specificità del metodo.

	Campione 1	Campione 2	
	Sp	Se	Sp
stx1	100%	100%	NA
stx2	100%	100%	NA
eae	NA	100%	NA
wzxO26	NA	83.3%	NA

Il calcolo di **Se nella fase di isolamento** si è basato sui risultati forniti dal campione 2 da parte di tutti i partecipanti NRLs. La Se della fase di isolamento è stata calcolata al 92.6%

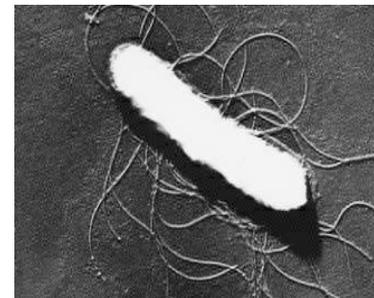


CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati forniti dai 25 Laboratori Ufficiali partecipanti induce alle seguenti conclusioni:

- Come per le scorse edizioni, è stato osservato un **tasso di partecipazione elevato**, a conferma del consolidamento della rete dei Laboratori Ufficiali che conducono analisi per STEC.
- Diversi Laboratori hanno ricevuto i campioni a una temperatura superiore ai 10°C, tuttavia questo sembra non aver influito sulla stabilità dei campioni, in quanto la maggior parte dei laboratori è riuscita a identificare ed isolare lo STEC dal campione contaminato.
- **I geni di virulenza** del ceppo STEC contaminante **sono stati identificati con una sensibilità del 100%** nel campione contaminato.
- Cinque partecipanti non hanno rilevato il sierogruppo O26 per il campione 2 nella fase di screening. Di questi, un Laboratorio (L020) ha erroneamente riportato la presenza dei sierogruppi O103 e O145, sia nella fase di screening, che nel ceppo STEC isolato. Tuttavia, quest'ultimo laboratorio ha informato il LNR per *E. coli* che, grazie alla partecipazione al PT39, ha potuto identificare una problematica relativa al software di analisi della Real Time PCR del kit in uso presso il Laboratorio, e correggere l'identificazione del sierogruppo O26.
- I Laboratori che non hanno riportato il sierogruppo del ceppo né nella fase di screening, né nella fase di isolamento, verranno contattati dall'LNR per *E. coli* per chiarire se sia dovuto ad una problematica connessa a questo saggio o se non venga effettuata la ricerca dei sierogruppi.
- Solo **due Laboratori, L009 e L020**, hanno ottenuto **punti di penalità corrispondenti ad una prestazione non soddisfacente**. Tuttavia, le penalità ricevute non riguardavano la mancata identificazione del campione positivo per STEC, ma erano associate alla incorretta identificazione dei sierogruppi. Tale risultato è già stato approfondito per L020, e dovrà essere indagato anche per L009, che ha riportato la presenza simultanea di tutti e cinque i sierogruppi nel ceppo STEC isolato dal campione 2.

I risultati del PT39 condotto a livello nazionale, hanno messo in evidenza **l'ottima performance della rete dei laboratori ufficiali** nell'analisi di campioni di alimenti per la presenza di *Escherichia coli* produttori di Shiga Tossine.



- A tutti i laboratori che hanno partecipato
- Ai colleghi del lab. nazionale di Riferimento per *E. coli*
- **E grazie a voi tutti per l'attenzione.**