

PT40

**sull'identificazione della presenza di ceppi di *Escherichia coli*
produttori di Shiga tossina (STEC) in campioni di acqua di
germogliazione – 2024**



Obiettivi dello studio

Il PT40 consisteva nell'identificazione e isolamento di un ceppo di *Escherichia coli* produttore di Shiga Tossina (STEC) in campioni di acqua di germogliazione.

- accrescere l'esperienza dei Laboratori Ufficiali nell'analisi di acqua di germogliazione, matrice indicata nel Reg. (UE) 209/2013 che stabilisce un criterio microbiologico specifico per STEC;
- fornire un ulteriore supporto ai Laboratori Ufficiali per l'accreditamento del metodo ISO/TS 13136:2012;
- migliorare la preparazione dei Laboratori Ufficiali nell'identificazione e l'isolamento di ceppi STEC non appartenenti al sierogruppo O157



Partecipanti

17 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti:

8 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS)

2 Agenzie di Tutela della Salute (ATS)

1 Laboratorio di sanità pubblica (azienda USL)



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



Campioni

L'acqua di germogliazione è stata reperita in un lotto unico da un produttore locale

Valutazione della microflora batterica naturale ➡ 10^7 CFU/ml di acqua di germogliazione ➡ $1,8 \times 10^6$ CFU di enterobatteri per millilitro di acqua di germogliazione

Screening per la presenza di STEC applicando il metodo ISO TS 13136:2012, dopo il pretrattamento descritto nelle istruzioni fornite ai partecipanti (centrifugazione dei 200 ml a 5000 rpm per 30 min a +4°C e risospensione del pellet in 10X il volume del pellet con BPW) e arricchimento in BPW a 41.5°C ➡ negativo



Campioni

Contaminante (<i>Genotipo</i>)	Livello di contaminazione in:	
	Campione 1	Campione 2
Ceppo ED0963, STEC O104:H7 (<i>stx1+</i> , <i>stx2-</i> , <i>eae-</i>)	-	50 CFU/ml

Stabilità

- Le prove di stabilità sono state eseguite dopo 0, 3, 7 e 9 giorni dalla contaminazione iniziale
- Screening in Real Time PCR era positivo per i geni target del ceppo STEC anche dopo 9 giorni
- Isolamento del ceppo STEC ottenuto entro 7 giorni

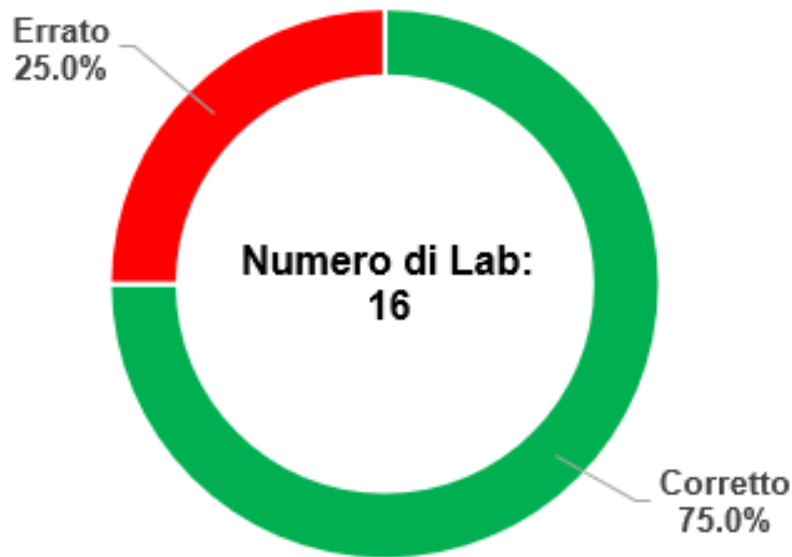


Campioni

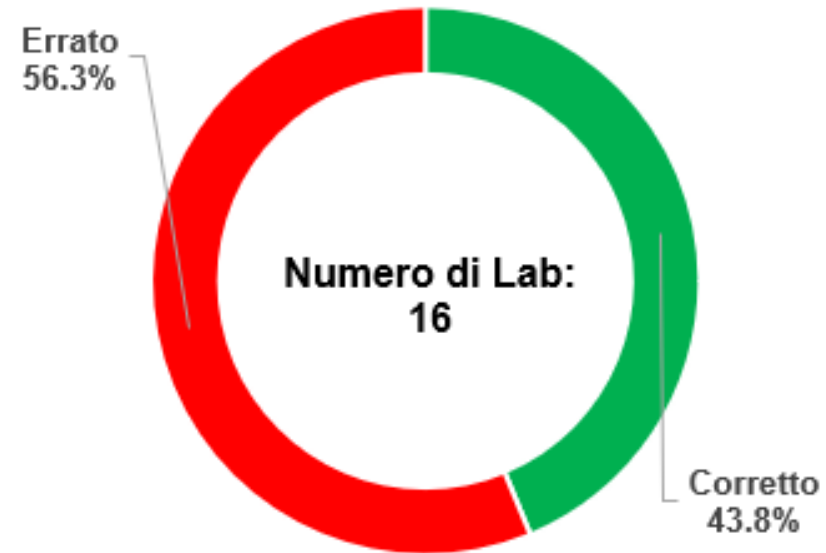
- Campioni etichettati con codici numerici generati casualmente
- Spediti il 14 Ottobre 2024
- 16 su 17 laboratori hanno riportato i risultati su un sito web dedicato sviluppato dall'EURL per *E. coli*
- Omogeneità condotta su sei bottiglie per ciascuno dei due livelli di contaminazione selezionate in modo casuale ➡ ottenuti i risultati attesi



Percentuale di laboratori che hanno rilevato correttamente i geni nella fase di screening (a) e isolato il ceppo STEC (b) presente nel campione 2



a) Screening



b) Isolamento

Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogrupo nelle colture di arricchimento

Campione 1		Campione 2	
Valore atteso	Campione negativo	Valore atteso	<i>stx1</i> ; O104
L009		L009	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; O104
L010	<i>eae</i> ; -	L010	-
L028		L028	<i>stx1</i> ; -
L350		L350	
L422		L422	
L501		L501	
L702		L702	
L831		L831	<i>stx1</i> ; -
L909		L909	
L989		L989	
L991		L991	
L992		L992	<i>stx1</i> ; -
L994		L994	<i>stx1</i> ; -
L995		L995	<i>stx1</i> ; -
L996		L996	
L997		L997	

Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC dai campioni di acqua di germogliazione

Campione 1		Campione 2	
Valore atteso	Isolamento non eseguito	Valore atteso	<i>stx1</i> ; O104
L009		L009	isolamento non raggiunto
L010		L010	isolamento non eseguito
L028		L028	<i>stx1</i> ; -
L350		L350	
L422		L422	isolamento non raggiunto
L501		L501	
L702		L702	
L831		L831	isolamento non raggiunto
L909		L909	
L989		L989	
L991		L991	
L992		L992	isolamento non raggiunto
L994		L994	isolamento non raggiunto
L995		L995	isolamento non raggiunto
L996		L996	
L997		L997	isolamento non raggiunto

Valutazione della performance dei Laboratori nella fase di screening:

- **4 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione della presenza dei geni stx1 e stx2.
- **2 punti** di penalità per l'errata identificazione del gene eae e del sierogruppo O104

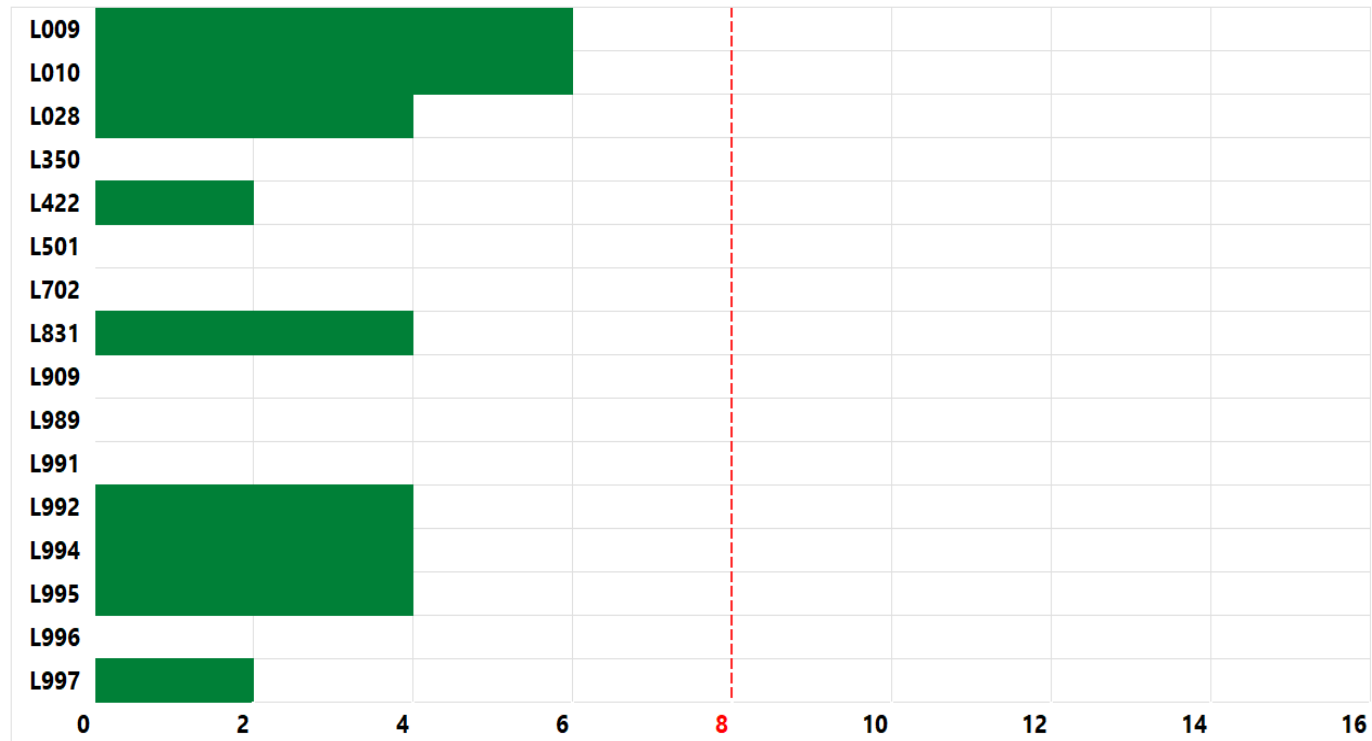
e di isolamento:

- **2 punti** di penalità in caso di mancato isolamento di STEC dal campione 2
- **4 punti** per l'errata identificazione dei geni stx
- **2 punti** per l'errata identificazione del sierogruppo O104

Soglia di otto punti di penalità per definire una competenza non soddisfacente



Valutazione della competenza



La barra rossa indica una competenza non soddisfacente (>8)

Valutazione delle prestazioni del metodo

La sensibilità (*Se*) e la specificità (*Sp*) sono state calcolate per le fasi di screening e isolamento

Se e *Sp* nella fase di screening:

	<i>Se</i>	<i>Sp</i>
<i>stx1</i>	100%	100%
<i>stx2</i>	NA	96.9%
<i>eae</i>	NA	96.9%
<i>WZX</i> _{O104}	66.7%	NA

Se della fase di isolamento: 53.3%

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

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



Conclusioni

- Elevata partecipazione da parte dei Laboratori coinvolti nel controllo Ufficiale degli alimenti e ottime prestazioni nell'identificazione della contaminazione dei campioni analizzati
- Tutti i Laboratori partecipanti hanno dimostrato una performance soddisfacente, riportando un totale di punti di penalità inferiore a otto
- Un solo Laboratorio non ha identificato la presenza dei geni *stx* nella fase di screening
- Circa la metà dei Laboratori partecipanti non ha raggiunto l'isolamento del ceppo STEC dal campione 2 ➡ LOD₅₀ 24 CFU/ml
- I risultati del PT40 hanno messo in evidenza un ottimo livello del network dei laboratori ufficiali nell'analisi di acqua di germogliazione per la presenza di STEC

***Grazie a tutti i partecipanti
e grazie per l'attenzione!***



Ai laboratori è stato richiesto di identificare la presenza di STEC utilizzando la procedura di pre-trattamento dei campioni disponibile sul sito web del laboratorio di riferimento dell'UE per E. coli (EURL-VTEC_Method_09_Rev 1: “Laboratory procedures for testing spent irrigation water for the presence of STEC”), seguita dal metodo ISO TS 13136:2012, eseguendo l’arricchimento dei campioni in acqua peptonata a 41.5 °C e tenendo conto dell'adattamento fornito dall’EURL per E. coli per la rilevazione specifica di STEC O104:H4 (EU RL VTEC_Method_04_Rev2: “Identificazione di Escherichia coli produttore di verocitotossina (VTEC) O104:H4 negli alimenti mediante Real Time PCR”).