



**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**

A cura di:

*Arnold Knijn, Rosangela Tozzoli, Paola Chiani, Guendalina Fornari Luswergh, Valeria Michelacci, Fabio Minelli,
Margherita Montalbano Di Filippo, Theodora Socheri, Stefano Morabito*



1. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT39 consisteva nell'identificazione e isolamento di un ceppo STEC in due campioni di formaggio.

Gli obiettivi dello studio erano:

- 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 Laboratori Ufficiali per l'accREDITAMENTO della ISO TS 13136:2012.

Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione completo dello studio organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli*.

2. PARTICIPANTI

Al PT39 hanno aderito 26 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti di seguito elencati. 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.

In particolare, hanno partecipato i seguenti laboratori:

- APPA della Provincia Autonoma di Bolzano
- ATS Brianza, Oggiono (LC)
- ARPA Valle d'Aosta, Aosta
- IZS dell'Abruzzo e Molise, Sede di Teramo
- IZS del Lazio e Toscana, Sede di Roma
- IZS del Lazio e della Toscana LT, Sede di Pisa



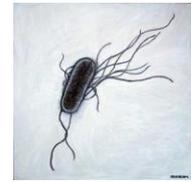
- IZS del Mezzogiorno, Sede di Portici
- IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Bologna
- IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Brescia
- IZS della Puglia e della Basilicata, Sede di Putignano (BA)
- IZS della Puglia e della Basilicata, Sede di Foggia
- Laboratorio di Sanità Pubblica Firenze - Azienda USL TC, Firenze
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Genova
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Novara
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino, S.C. Tecnologie Applicate e Produzioni
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino, S.C. Sicurezza e Qualità degli Alimenti
- IZS della Sardegna, Sede di Sassari
- IZS della Sicilia, Sede di Palermo
- IZS della Sicilia, Sede di Catania
- IZS dell'Umbria e delle Marche, sede di Fermo
- IZS Umbria e Marche, Sede di Perugia
- IZS delle Venezie, Sede di Legnaro (PD)
- IZS delle Venezie, Sede di Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, Sede di San Donà di Piave (VE)
- IZS delle Venezie, Sede di Trento
- IZS delle Venezie, Sede di Vicenza

Dopo aver riportato i risultati, ciascun Laboratorio Ufficiale ha ricevuto un proprio rapporto individuale di partecipazione indicante i risultati attesi e quelli riportati per ciascun campione.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

Il formaggio utilizzato nello studio è stato acquistato da un rivenditore locale. 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



Tamponata (Buffered Peptone Water, BPW). Non è stata osservata alcuna crescita su entrambi i terreni. Due campioni costituiti da 25 g di formaggio sono stati analizzati per la presenza di STEC applicando il metodo ISO TS 13136:2012. Entrambi i campioni erano negativi per tutti i geni target.

Due campioni di prova (1 e 2), costituiti ciascuno da 25 g di formaggio potenzialmente contaminato da STEC, sono stati inviati ai Laboratori partecipanti. Le caratteristiche dei campioni contaminati sono riportate nella Tabella 1.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 17 maggio 2024, utilizzando opportune diluizioni di una coltura liquida in fase esponenziale (OD_{600} pari a 0,5) del ceppo STEC C1188-02 (incertezza di misura di 0,209 log CFU/ml, calcolata utilizzando la procedura descritta nella norma ISO TS 19036:2006). Diluizioni seriali delle sospensioni di inoculo del ceppo C1188-02 utilizzate per arricchire i campioni sono state seminate su piastre di agar MacConkey per confermarne il titolo.

I campioni di prova sono stati etichettati con codici numerici generati casualmente, diversi per ciascun laboratorio, e conservati a 4°C fino alla spedizione refrigerata il 20 maggio 2024 tramite corriere. Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di registrare la data di consegna e la temperatura del campione al momento del ricevimento e di avviare le analisi immediatamente.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di formaggio utilizzati nello studio

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

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state valutate secondo i requisiti della norma ISO 17043:2010.

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.



Al momento dell'invio, sei campioni sono stati selezionati in modo casuale per il test di omogeneità tra i campioni preparati per la spedizione. Tutti sono stati arricchiti in BPW a 37°C e analizzati mediante Real Time PCR per la presenza del ceppo STEC contaminante il 20 maggio 2024, ottenendo i risultati attesi sia nello screening in Real Time PCR per i geni target che per l'isolamento del ceppo STEC O26. Allo stesso modo, tutte e sei le repliche selezionate dai campioni non contaminati erano, come atteso, negative per la presenza di STEC.

3.2. Metodi di Laboratorio

Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di identificare la presenza di STEC utilizzando il metodo ISO TS 13136:2012, utilizzando BPW come terreno di arricchimento.

3.3. 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.

3.4. Valutazione della performance dei Laboratori nella fase di screening delle colture di arricchimento mediante Real Time PCR

La competenza dei Laboratori è stata valutata mediante l'assegnazione di punti di penalità. In particolare, 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.

3.4 Valutazione della performance dei Laboratori nell'isolamento del ceppo STEC

Le prestazioni di ciascun Laboratorio nell'isolare e caratterizzare il ceppo STEC sono state valutate assegnando 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).

3.5 Valutazione della prestazione dei Laboratori nell'intera procedura

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.

3.6 Valutazione delle prestazioni del metodo

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

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

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

4. RISULTATI

I campioni sono stati spediti ai 26 Laboratori, e 25 partecipanti hanno riportato i risultati. Il Laboratorio che non ha inviato i risultati è stato contattato dal LNR per *E. coli* per chiarire la problematica riscontrata (entrambi i campioni risultavano sterili) e concordare azioni per la gestione della mancata partecipazione al PT39.

I campioni sono stati spediti il 20 maggio 2024 e ricevuti da 19 Laboratori entro le 24 ore e da sei entro le 48 ore. Cinque Laboratori non hanno riportato la temperatura dei campioni alla ricezione; tuttavia, hanno dichiarato che i campioni erano arrivati refrigerati e in condizioni buone o soddisfacenti. Dieci Laboratori hanno ricevuto i campioni a una temperatura compresa tra 4°C e 10°C. Gli altri 10 Laboratori hanno riportato temperature di ricezione superiori ai 10°C, con in particolare due partecipanti che hanno registrato la temperatura di ricezione di 19.4°C e 20.2 °C.

I risultati presentati dai laboratori partecipanti sono schematizzati nelle **Figure 1 – 3**.

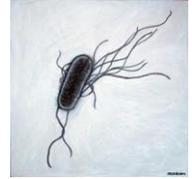


Figura 1. Percentuale di laboratori che hanno rilevato correttamente i geni nella fase di screening (a) e isolato il ceppo STEC (b) presente nel campione 2 (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato, che comprende sia il mancato isolamento che l'incorretta caratterizzazione del ceppo STEC isolato).

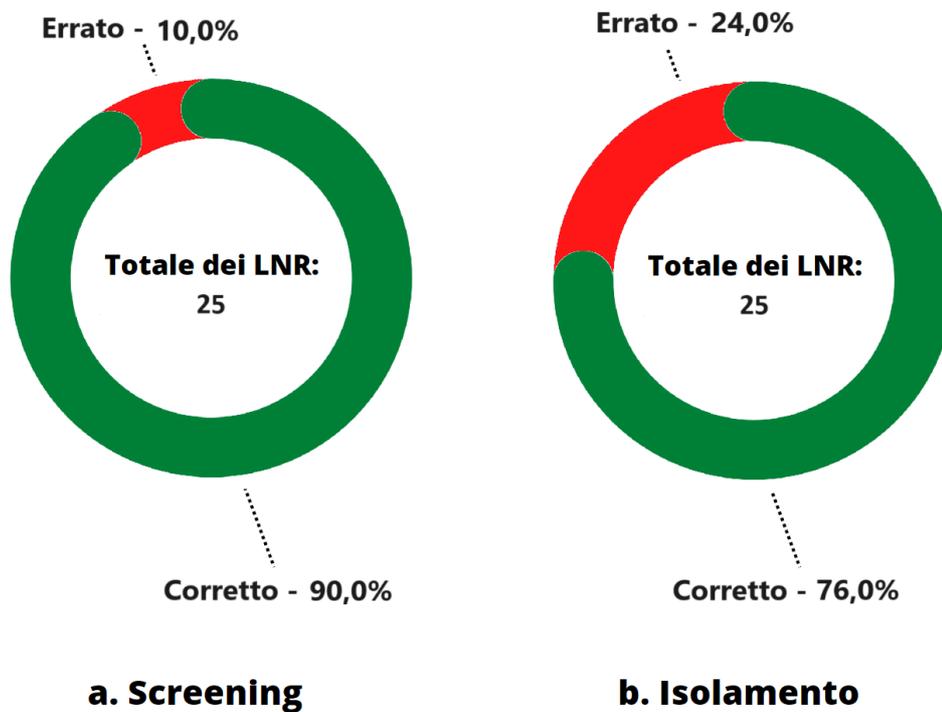




Figura 2. Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogruppo nelle colture di arricchimento (i riquadri gialli rappresentano i gold standard; i riquadri verdi: risultati corretti e i riquadri rossi: risultati errati).

Campione 1		Campione 2	
Valore atteso	Campione negativo	Valore atteso	<i>stx1; stx2; eae; O26</i>
L009		L009	<i>stx1; stx2; eae</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	<i>stx1; stx2; eae</i>
L033		L033	<i>stx1; stx2; eae</i>
L350		L350	
L422		L422	
L501		L501	
L684		L684	
L702		L702	
L831		L831	
L988		L988	
L989		L989	
L990		L990	
L991		L991	
L992		L992	
L997		L997	
L998		L998	



Figura 3. 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).

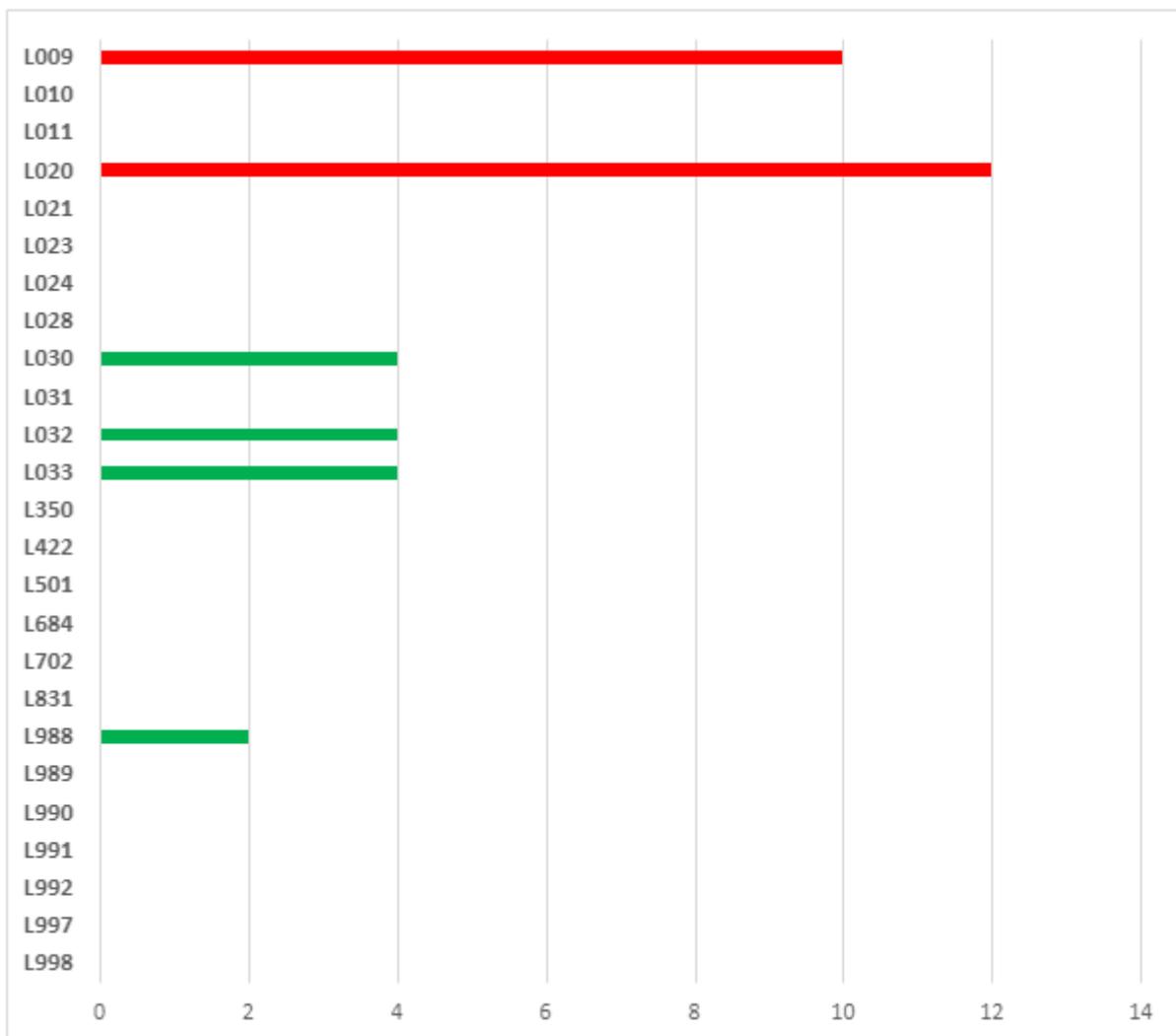
Campione 1		Campione 2	
Valore atteso	Isolamento non eseguito	Valore atteso	<i>stx1; stx2; eae; O26</i>
L009		L009	<i>stx1;stx2;eae ;O26;O103;O111;O145;O157</i>
L010		L010	
L011		L011	
L020		L020	<i>stx1; stx2; eae; O103; O145</i>
L021		L021	
L023		L023	
L024		L024	
L028		L028	
L030		L030	<i>stx1; stx2; 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	



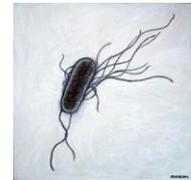
La *performance* analitica dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 3.3 - 3.4.

La **Figura 4** mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti, assegnati per i risultati non corretti riportati per la fase di screening e di isolamento del ceppo STEC.

Figura 4. Valutazione della *performance* dei Laboratori nella fase di screening e di isolamento. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti ai paragrafi 3.4 – 3.5. La *performance* dei laboratori è stata considerata non adeguata per i punteggi superiori a 8 (barra rossa).



Il calcolo di **Se e Sp nella fase di screening** ha restituito i seguenti risultati:



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

La **Se della fase di isolamento** è stata calcolata al 92.6%.

5. CONCLUSIONI

Il consolidamento dell'applicazione del metodo standard ISO TS 13136:2012 è fondamentale per garantire un approccio armonizzato all'analisi degli alimenti per la presenza di STEC. L'analisi dei risultati forniti dai 25 Laboratori Ufficiali partecipanti induce alle seguenti conclusioni:

1. 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;
2. 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.
3. I geni di virulenza del ceppo STEC contaminante sono stati identificati con una sensibilità del 100% nel campione contaminato.
4. 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.
5. 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.

6. 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 associati 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.

In conclusione, 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.