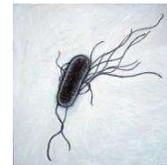




**Risultati del 43° studio inter-laboratorio nazionale
(PT43) sull'identificazione di *E. coli* produttori di
Shiga-tossina (STEC) in campioni di germogli - 2025**

A cura di:

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



1. OBIETTIVI DELLO STUDIO INTERLABORATORIO

Lo scopo del PT43 era l'identificazione e l'isolamento di STEC in campioni di germogli, ed aveva i seguenti obiettivi:

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

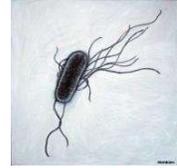
Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione completo dello studio.

2. PARTICIPANTI

Ventitré Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT43. I Laboratori afferivano a 19 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), della Brianza e di Milano, due Agenzia provinciale per l'ambiente (ARPA) della Valle d'Aosta e del Friuli-Venezia Giulia e all'azienda USL Toscana Centro.

In particolare, hanno partecipato i seguenti laboratori:

- ATS Brianza, Oggiono (LC)
- ATS Città Metropolitana di Milano
- ARPA Valle d'Aosta, Aosta
- ARPA Friuli-Venezia Giulia, Udine
- Azienda USL Toscana Centro, Firenze
- IZS Abruzzo e Molise, sede di Teramo
- IZS Abruzzo e Molise, sede di Pescara
- IZS Abruzzo e Molise, sede di Campobasso
- IZS del Lazio e Toscana, Sede di Roma
- IZS del Lazio e della Toscana, 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 Umbria e Marche, Sede di Fermo
- IZS Umbria e Marche, Sede di Perugia
- Laboratorio di Sanità Pubblica Firenze - Azienda USL TC, Firenze
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino, Biotecnologie
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino, Controllo Alimenti
- IZS della Sicilia, Sede di Palermo
- IZS della Sicilia, Sede di Catania
- IZS delle Venezie, Sede di Legnaro (PD)
- IZS delle Venezie, Sede di Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, Sede di Trento

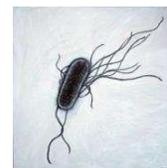
3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

I Laboratori partecipanti hanno ricevuto tre campioni di prova incogniti (campioni 1, 2 e 3), ciascuno costituito da 25 g di germogli di erba medica potenzialmente contaminati da STEC. I germogli utilizzati sono stati acquistati come lotto unico da un produttore locale e contenevano una microflora batterica naturale pari a 6×10^6 CFU/g di germogli (3×10^6 CFU di enterobatteriacee per grammo di germogli). I germogli sono stati porzionati in campioni da 25 g in sacchetti da stomacher sterili e posti a + 4°C fino alla contaminazione. Due porzioni da 25 g di germogli dello stesso lotto sono state inizialmente testate per la presenza di STEC applicando il metodo ISO TS 13136:2012. Entrambi i campioni erano negativi allo screening per tutti i geni target.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 31 marzo 2025, utilizzando opportune diluizioni di una coltura liquida esponenziale (OD_{600} pari a 0,5) del ceppo STEC C1178-04 (O145:H28) che possiede il gene *stx1* ed è positivo per la presenza del gene *eae*. Le caratteristiche dei campioni sono riportate in Tabella 1.

All'inoculo standardizzato è stata associata un'incertezza di misura pari a 0.37 log CFU/ml, calcolata secondo la procedura descritta nella norma ISO TS 19036:2006. I tre campioni corrispondevano a tre diversi livelli di contaminazione: zero, basso e alto (Tabella 1). Diluizioni



seriali delle sospensioni di inoculo del ceppo C1178-04 utilizzate per la contaminazione dei campioni sono state piastrate su Mac Conkey agar per confermare il titolo.

I campioni incogniti sono stati etichettati con codici numerici generati casualmente, diversi per ciascun laboratorio, e sono stati conservati a +4°C fino alla spedizione refrigerata, effettuata lo stesso giorno della contaminazione, il 31 marzo 2025, tramite corriere. Ai Laboratori 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 germogli utilizzati nello studio

Contaminante (<i>Genotipo</i>)	Livello di contaminazione:		
	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Ceppo C1178-04, STEC O145:H28 (<i>stx1+</i> , <i>stx2-</i> , <i>eae+</i> , <i>ihp1</i> _{O145+})	-	Bassa carica: 50 CFU/g	Alta carica: 200 CFU/g

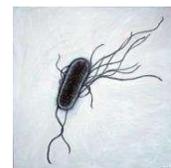
La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state valutate secondo quanto indicato nella norma ISO 17043:2010.

La stabilità è stata valutata utilizzando campioni di germogli della stessa specie contaminati il 6 febbraio 2025 e saggiati con il metodo ISO TS 13136:2012 dopo 0, 2, 4 e 7 giorni dalla contaminazione iniziale. Lo screening Real Time PCR è risultato positivo per i geni target STEC fino a 4 giorni dalla contaminazione. L'isolamento invece ha avuto successo sia per il livello di contaminazione basso che alto solo fino al secondo giorno dalla contaminazione.

Al momento della preparazione dei campioni di prova, sei campioni per ciascuno dei due livelli di contaminazione e sei campioni non contaminati, selezionati in modo casuale, sono stati saggiati per valutare l'omogeneità il 31 marzo 2025 mediante Real Time PCR per identificare la presenza dei geni associati STEC, ottenendo i risultati attesi.

3.2. Metodi di Laboratorio

Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di identificare la presenza di STEC utilizzando il metodo ISO TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento fornito dal laboratorio di riferimento dell'UE per *E. coli* (EURL-VTEC) per la rilevazione specifica di STEC O104:H4



(EURL VTEC_Method_04_Rev 1: “Identificazione di *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) O104:H4 negli alimenti mediante Real Time PCR”).

3.3. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I risultati sono stati raccolti attraverso un sito web sviluppato dall'EURL per *E. coli*. La scadenza per la sottomissione dei risultati era stata fissata al 22 aprile 2025.

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

La competenza dei Laboratori nell'identificazione dei geni *stx* nelle colture di arricchimento dei due campioni è stata valutata assegnando quattro punti di penalità per ogni risultato errato. Due punti di penalità sono stati assegnati per risultati incorretti relativi alla identificazione dei geni *eae* ed *ihp1*_{O145}, associato al sierogruppo O145.

3.5 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 dai campioni 2 e 3.

3.6 Valutazione della prestazione dei Laboratori nell'intera procedura

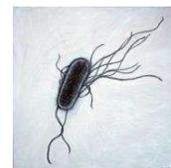
La somma dei punti di penalità ottenuti nelle diverse fasi della procedura ha dato origine ad un punteggio totale, utilizzato per valutare la prestazione complessiva dei Laboratori partecipanti. La *performance* dei Laboratori che hanno ottenuto un punteggio superiore a otto è considerata insoddisfacente.

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



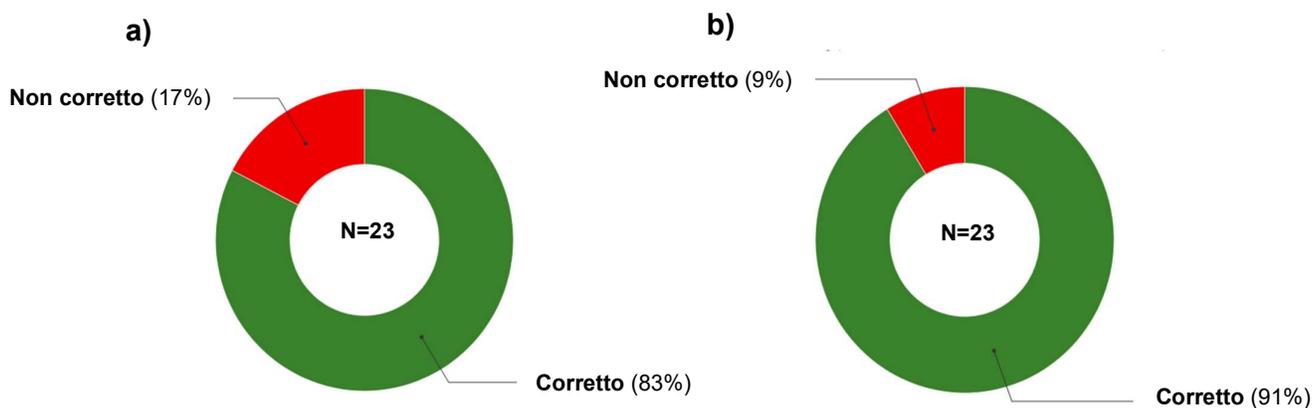
4. RISULTATI

I campioni sono stati spediti il 31 marzo 2025 ai 23 Laboratori ufficiali, e tutti i partecipanti hanno riportato i risultati.

La maggior parte dei partecipanti ha ricevuto i campioni in buone condizioni ed un solo Laboratorio ha riportato condizioni sufficienti.

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

Figura 1. Proporzione di Laboratori che hanno rilevato correttamente i geni nella fase di screening (a) e isolato il ceppo STEC (b) nei campioni 2 e 3 (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato).



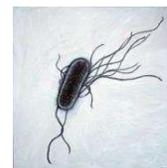


Figura 2. Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogruppo nelle colture di arricchimento (riquadri verdi: risultati corretti; riquadri rossi: risultati errati).

Campione 1		Campione 2		Campione 3	
Gold Standard - Negativo		Gold Standard – <i>stx1, eae, O145</i>		Gold Standard – <i>stx1, eae, O145</i>	
L009		L009		L009	
L010		L010		L010	
L011		L011		L011	
L020		L020	<i>stx1, stx2, eae, O145</i>	L020	<i>stx1, stx2, eae, O145</i>
L021		L021	<i>stx1, stx2, eae, Top 5 and O104</i>	L021	<i>stx1, stx2, eae, Top 5 and O104</i>
L023		L023		L023	
L028		L028		L028	
L031		L031		L031	
L350		L350		L350	
L422		L422		L422	
L501		L501		L501	
L618		L618	<i>stx1, stx2, eae, O145</i>	L618	<i>stx1, stx2, eae, O145</i>
L702		L702		L702	
L831		L831		L831	
L990		L990		L990	
L991		L991		L991	
L992		L992		L992	
L994		L994		L994	
L995		L995		L995	
L996		L996		L996	
L997		L997		L997	
L998		L998		L998	
L999		L999	<i>stx1, eae, -</i>	L999	<i>stx1, eae, -</i>

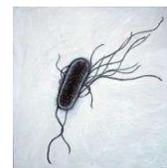


Figura 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC dai campioni di germogli. (caselle verdi: risultati corretti; caselle rosse: risultati errati).

Campione 1		Campione 2		Campione 3	
Gold Standard – No Isolamento		Gold Standard – <i>stx1, eae, O145</i>		Gold Standard – <i>stx1, eae, O145</i>	
L009		L009	<i>stx1, eae, -</i>	L009	
L010		L010		L010	
L011		L011		L011	
L020		L020	Isolamento non riuscito	L020	<i>stx1, stx2, eae, O145</i>
L021		L021		L021	
L023		L023		L023	
L028		L028		L028	
L031		L031		L031	
L350		L350		L350	
L422		L422		L422	
L501		L501		L501	
L618		L618	Isolamento non riuscito	L618	Isolamento non riuscito
L702		L702		L702	
L831		L831		L831	
L990		L990		L990	
L991		L991		L991	
L992		L992		L992	
L994		L994		L994	
L995		L995		L995	
L996		L996		L996	
L997		L997		L997	
L998		L998		L998	
L999		L999	<i>stx1, eae, -</i>	L999	<i>stx1, eae, -</i>

Il laboratorio L020 ha informato nel campo note di aver riscontrato la presenza del sierogruppo O45 nella fase di screening.

La *performance* analitica dei Laboratori è stata valutata e 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.

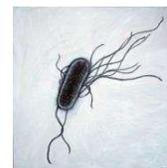
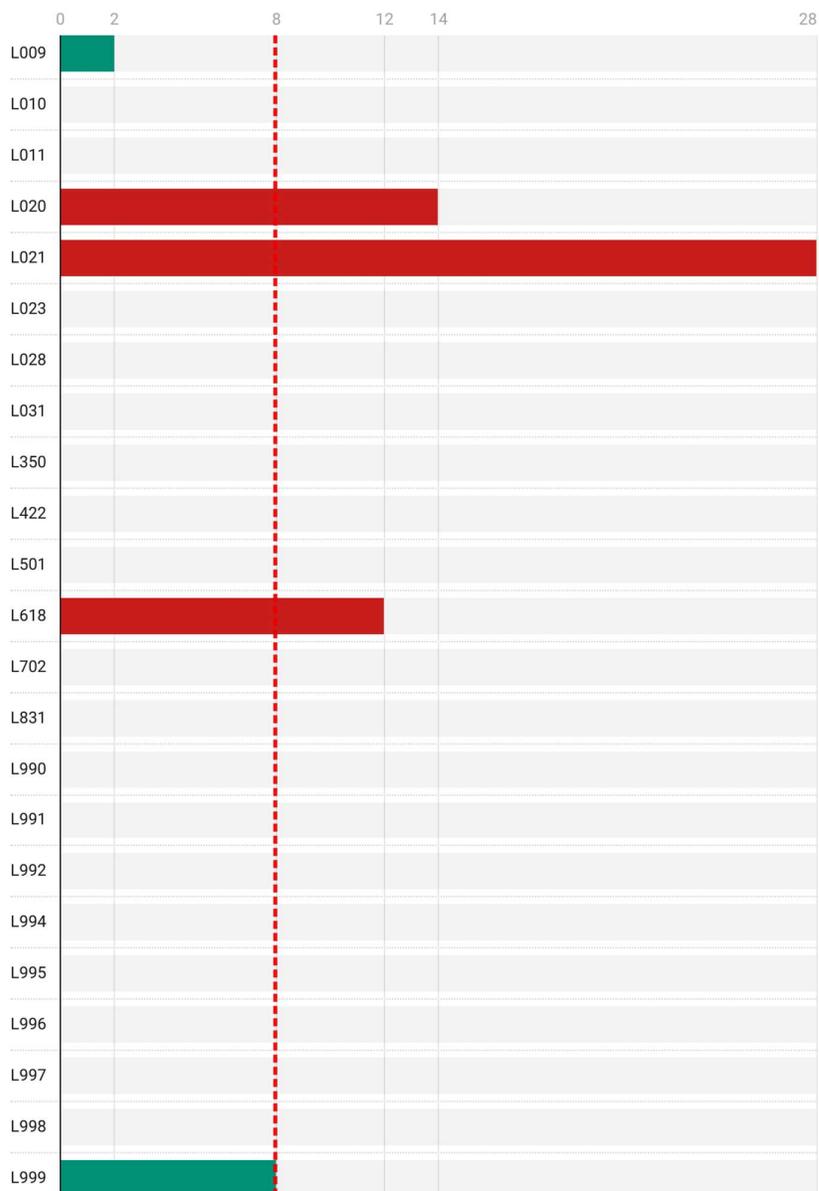
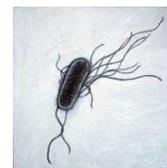


Figura 4. Valutazione della *performance* dei Laboratori nella fase di screening e di isolamento. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti ai paragrafi 3.4 – 3.6. La *performance* dei laboratori è stata considerata non adeguata per punteggi superiori a 8 (barra rossa).





In seguito alla chiusura dei termini per la raccolta dei risultati, il Laboratorio L021 ha informato che ha erroneamente riportato tutti i geni di virulenza e associati a sierogruppi ricercati nella fase di screening e non solo quelli rilevati, che erano soltanto *stx1*, *eae*, O145. Pertanto, i risultati del Laboratorio L021 sono stati esclusi dal calcolo della sensibilità e specificità per tutti i target. Per il calcolo della specificità della determinazione del gene *stx2*, è stato escluso anche il risultato riportato dal laboratorio L020, in quanto, come indicato dal Laboratorio partecipante nel campo note, il kit utilizzato non permetteva di discriminare tra *stx1* ed *stx2*.

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

	Campione 1		Campione 2		Campione 2	
	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se
<i>stx1</i>	100%	100%	NA	100%	NA	100%
<i>stx2</i>	100%	NA	95.2%	NA	95.2%	NA
<i>eae</i>	NA	100%	100%	100%	100%	100%
<i>ihp1</i>_{O145}	NA	95.4%	NA	95.4%	NA	95.4%

La **Se della fase di isolamento** è stata calcolata al 91.3 % per il campione 2 (bassa carica) e 95.7% per il campione 3 (alta carica).

5. CONCLUSIONI

Lo scopo di questo studio era di identificare la presenza di STEC in campioni di germogli, l'unica matrice per la quale esiste un criterio microbiologico per STEC (Reg. (UE) 209/2013). I risultati del PT43 mettono in evidenza un'elevata partecipazione da parte dei Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, che hanno mostrato ottime prestazioni nell'identificazione del ceppo STEC contaminante. Un Laboratorio partecipante (L021) ha riportato un elevato numero di punti di penalità. Tuttavia, come comunicato dal laboratorio stesso, questo è stato dovuto ad un incorretto inserimento dei risultati, piuttosto che a causa di un problema tecnico nell'applicazione della metodologia. Oltre al Laboratorio L021, altri due Laboratori hanno superato la soglia stabilita per identificare *performance* non soddisfacenti e verranno contattati.