



**Risultati del 12° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione
della presenza di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) e
altri *E. coli* patogeni in campioni di germogli - 2013**

A cura di:

*Susan Babsa, Alfredo Caprioli, Clarissa Ferreri, Fabio Galati, Maria Luisa Marziano, Antonella Maugliani,
Fabio Minelli, Stefano Morabito, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli*

1. INTRODUZIONE

Il 12° studio inter-laboratorio (*Proficiency test*, PT) sulla ricerca e l'identificazione dei ceppi di *E. coli* patogeni è stato organizzato nel 2013 dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, ai fini della valutazione esterna di qualità dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti ed è stato dedicato alla ricerca di VTEC e altri *E. coli* patogeni in campioni di germogli di erba medica e crescione. La scelta di questa matrice è dovuta alle seguenti ragioni:

- I germogli sono un alimento *ready to eat* che negli ultimi anni è stato associato a numerosi focolai epidemici di infezione da Salmonella e VTEC.
- I germogli sono stati la causa della gravissima epidemia di infezione da VTEC O104:H4 che ha colpito la Germania nel 2011.
- Il Regolamento (EU) 209/2013, in vigore dal 1 Luglio 2013, ha integrato il Regolamento (EC) 2073/2005, introducendo per i germogli un criterio microbiologico che prevede l'assenza di VTEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 in 25 g di prodotto e prescrive l'uso del metodo CEN/ISO/TS 13136 per la loro ricerca.

Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferimento (EU-RL) per questo patogeno, lo studio nazionale è stato condotto contestualmente a quello dedicato agli LNR per *E. coli* degli Stati Membri della UE, che ha visto la partecipazione di 38 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare, rappresentanti tutti i 28 Stati Membri dell'Unione Europea, la Norvegia, la Svizzera, l'Argentina e l'Egitto. Il report dello studio europeo è disponibile al sito web dell'EU-RL (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/PT12_Report.pdf).

2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

L'obiettivo dello studio è stato quello di accrescere l'esperienza dei laboratori:

- i) nell'uso del metodo molecolare standard per la ricerca dei VTEC, in particolare analizzando una matrice per cui ora è stato stabilito un criterio microbiologico specifico per i VTEC;
- ii) nella ricerca negli alimenti di altri gruppi patogeni di *E. coli*, quali: *E. coli* Enteroaggregativi (EAggEC), *E. coli* Enterotossigenici (ETEC), *E. coli* Enteroinvasivi (EIEC). Questi patogeni costituiscono una causa importante di diarrea del viaggiatore, ma sono stati anche associati a casi sporadici ed episodi epidemici di origine alimentare nei paesi industrializzati.

3. PARTECIPANTI

Al PT hanno aderito 11 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti a 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna
- IZS del Mezzogiorno, Sezione di Salerno, U.O. Microbiologia Alimentare, Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O.S."Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM", Portici (Napoli)
- IZS della Sicilia, Area Microbiologia degli Alimenti, Palermo
- IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici PGCB, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo
- IZS delle Venezie, Sezione Pordenone e Udine, Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, *OIE/National Reference Laboratory for Salmonellosis*, Legnaro (PD)

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I germogli utilizzati nello studio erano una miscela commerciale acquistata al dettaglio, costituita per il 90 % da erba medica (alfa-alfa) e per il 10 % da crescione. I germogli contenevano una flora microbica naturale ed erano negativi ai test PCR effettuati per la ricerca dei geni bersaglio oggetto del PT. Ai Laboratori sono stati inviati tre campioni (A, B e C), costituiti da 25 g di germogli e potenzialmente contaminati con VTEC o ceppi appartenenti agli altri gruppi di *E. coli* patogeni.

La contaminazione artificiale dei campioni, contenuti in sacchetti da *stomacher*, è stata effettuata il 18 Novembre 2013 utilizzando diluizioni di colture in terreno liquido dei ceppi VTEC e EIEC descritti nella Tabella 1. Il titolo delle sospensioni in PBS utilizzate come inoculo, determinato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey, era 1.52×10^3 CFU per g di germogli per il ceppo VTEC e 1.84×10^2 CFU per g per il ceppo EIEC.

Le caratteristiche dei campioni sono riportate nella Tabella 1 e sono state considerate come "*gold standard*".

Tabella 1. Caratteristiche dei campioni di germogli inclusi nello studio

Contaminante (Genotipo)	Campione A	Campione B	Campione C
VTEC O157 (<i>vtx1</i> , <i>vtx2</i> , <i>eae</i>)	1.5 x 10 ³ CFU/g	-	-
EIEC (<i>ipaH</i>)	-	1.8 x 10 ² CFU/g	-

I campioni, identificati con codici numerici assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio, sono stati immediatamente trasferiti in contenitori di sicurezza refrigerati e spediti tramite corriere il giorno stesso della preparazione. Ai Laboratori è stata data l'indicazione di iniziare le analisi appena possibile, registrando la temperatura all'arrivo e la data di inizio analisi.

4.2. Stabilità e omogeneità dei campioni

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state verificate secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010.

Per la verifica della stabilità, un gruppo di campioni contaminati è stato preparato appositamente il 31 Ottobre 2013 con le stesse procedure utilizzate successivamente per la preparazione dei campioni da impiegare nel test. I campioni sono stati conservati a 4 °C per 8 giorni e analizzati nei giorni 31 Ottobre, 5 Novembre e 7 Novembre, sempre ottenendo i risultati attesi.

Per la verifica dell'omogeneità, 5 repliche di ognuno dei tre campioni test sono state selezionate casualmente subito dopo la preparazione e analizzate, ottenendo i risultati attesi.

4.3. Metodi di laboratorio

Secondo quanto prescritto dal Reg. (EU) No 2019/2013, ai laboratori partecipanti è stato richiesto di ricercare i VTEC appartenenti ai sierogruppi O157, O111, O26, O103, O145 e O104, utilizzando lo standard ISO/TS 13136 e la procedura prodotta dall'EU-RL per *E. coli* per la ricerca di VTEC O104:H4 (disponibile sul sito <http://www.iss.it/vtec>, sezione *Laboratory Methods*). Considerando che i contaminanti dei germogli sono in genere sottoposti a condizioni di stress, ai Laboratori è stata data l'indicazione di utilizzare *buffered peptone water* (BPW) come terreno di arricchimento.

Per la ricerca dei ceppi appartenenti agli altri gruppi di *E. coli* patogeni, le colture di arricchimento negative per la presenza di geni *vtx* venivano saggiate per i seguenti geni bersaglio:

- *aaiC* e *aggR* per gli EAggEC
- *lt*, *sth*, e *stp* per gli ETEC
- *ipaH* per gli EIEC

Le procedure operative standard (POS) di Real Time PCR per la ricerca di questi geni erano disponibili nel sito web dell'EU-RL (<http://www.iss.it/vtec>), sezione *Laboratory Methods*.

Per isolare i ceppi patogeni di *E. coli* responsabili delle reazioni PCR positive, le corrispondenti colture di arricchimento venivano seminate su appropriati terreni solidi e le colonie con morfologia compatibile con *E. coli* erano saggiate per la presenza dei geni di virulenza identificati nella fase di screening (fino a 50 colonie per campione). Per i ceppi VTEC la procedura per l'isolamento è descritta nello standard CEN/ISO/TS 13136. Per i ceppi appartenenti agli altri gruppi patogeni, i metodi erano descritti nelle rispettive POS, disponibili nel sito web dell'EU-RL.

Per i ceppi VTEC isolati era richiesta la determinazione dei geni *vtx1*, *vtx2*, *eae* e del sierogruppo. Per i ceppi appartenenti agli altri gruppi patogeni era richiesta la determinazione dei geni target di virulenza.

4.4. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando pagine dedicate accessibili attraverso la *Restricted Area* del sito web dell'EU-RL VTEC (www.iss.it/vtec), previa introduzione di *User ID* e *Password*, inviate a ogni laboratorio insieme al codice identificativo e alle istruzioni necessarie per il *log in*. Al termine del test, i partecipanti hanno avuto la possibilità di stampare direttamente il proprio *test-report* con i risultati inviati e quelli attesi.

4.5. Analisi dei risultati

4.5.1. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza nelle colture di arricchimento (fase di screening)

La *performance* è stata valutata assegnando punti di penalità per i geni identificati in maniera errata. I punti di penalità sono stati assegnati con i seguenti criteri, basati sulla rilevanza di sanità pubblica:

- **4 punti** per ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione dei geni *vtx*, che rappresentano il target principale del metodo ISO/TS 13136:2012, lo standard internazionale per la ricerca dei VTEC negli alimenti, oggetto dei precedenti PT. Inoltre, esiste ora un criterio microbiologico per i VTEC nel Regolamento (EU) 209/2013.

- **2 punti** per ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione degli altri geni di virulenza presi in considerazione nel PT (*eae*, *AggR*, *aaiC*, *lt*, *sth*, *stp*, *ipaH*).
- **1 punto** per ogni risultato riportato come "Non Eseguito".

4.5.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'isolamento dei ceppi di *E. coli* patogeni dalle colture di arricchimento PCR-positive

La *performance* è stata valutata assegnando punti di penalità per il mancato isolamento dei ceppi dai campioni positivi, con i seguenti criteri:

- **4 punti** per il mancato isolamento dei ceppi VTEC.
- **2 punti** per il mancato isolamento dei ceppi appartenenti agli altri gruppi patogeni.

4.5.3. Valutazione della performance dei laboratori nell'intera procedura

La somma dei punti di penalità assegnati nelle due fasi precedenti ha generato un punteggio totale, usato per valutare la performance di ogni laboratorio. In particolare, in punteggio uguale o superiore a 8 punti è stato fissato per identificare una performance non adeguata. La performance era ancora considerata adeguata per quei laboratori che totalizzavano un punteggio uguale a 8 senza errori riguardanti i geni *vtx* o l'isolamento dei ceppi VTEC.

5. RISULTATI

I campioni sono stati inviati il 18 Novembre e sono stati recapitati regolarmente ai Laboratori partecipanti entro 48 ore. Le temperature riportate andavano da 4 °C a 15 °C.

5.1. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento mediante Real-Time PCR

La Tabella 2 riporta i risultati della ricerca dei geni di virulenza nelle colture di arricchimento mediante Real-Time PCR. Tutti gli 11 Laboratori partecipanti allo studio hanno effettuato la ricerca dei geni associati ai VTEC (*vtx1*, *vtx2* and *eae*), riportandone correttamente la presenza/assenza. Due Laboratori non hanno effettuato la ricerca dei geni target degli altri gruppi patogeni (EAggEC, ETEC, EIEC). Dei 9 Laboratori che hanno effettuato questi test, solo uno (L115) ha prodotto un risultato falso negativo, mancando di identificare la presenza del gene *ipaH* nel campione B. Il metodo ISO/TS 13136:2012 prevede anche lo screening delle colture di arricchimento per la presenza di geni sierogruppo-specifici. Per il campione A, positivo per VTEC, tutti i laboratori hanno riportato correttamente la presenza/assenza dei geni associati ai sierogruppi nella coltura di arricchimento (Tabella 3).

Tabella 2. Ricerca dei geni di virulenza caratteristici dei diversi gruppi di *E. coli* patogeni nelle colture di arricchimento. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati. Le caselle vuote indicano che il test corrispondente non è stato effettuato.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:																											
	Campione A									Campione B									Campione C									
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>ipah</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>ipah</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>ipah</i>	
Valore atteso	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L115																			-									
L173																												
L381																												
L447																												
L469																												
L491																												
L547																												
L718																												
L854																												
L864																												
L910																												

Tabella 3. Ricerca dei geni di virulenza e sierogrupo-specifici nella coltura di arricchimento del campione A, secondo lo standard ISO/TS 13136:2012. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza e dei geni sierogrupo-associati nel campione A								
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>O157</i>	<i>O26</i>	<i>O103</i>	<i>O111</i>	<i>O145</i>	<i>O104</i>
Valore atteso	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L115									
L173									
L381									
L447									
L469									
L491									
L547									
L718									
L854									
L864									
L910									

5.2. Isolamento dei ceppi di *E. coli* patogeni dai campioni PCR-positivi

La successiva fase dell'isolamento dei ceppi patogeni di *E. coli* è stata condotta correttamente da 9 Laboratori per quanto riguardava il ceppo VTEC O157 presente nel campione A e da 6 Laboratori per il ceppo EIEC presente nel campione B (Tabella 4).

Tabella 4. Isolamento e genotipizzazione dei ceppi di *E. coli* patogeni dalle colture di arricchimento PCR-positive. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse il mancato isolamento o i risultati sbagliati. Le caselle vuote indicano che il test corrispondente non è stato effettuato.

Lab	Isolamento e genotipizzazione dei ceppi di <i>E. coli</i> patogeni da:						
	Campione A					Campione B	
	Patogruppo	Genotipo				Patogruppo	Genotipo <i>ipah</i>
		Sierogruppo	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>		
Valore atteso	Isolamento VTEC	O157	+	+	+	Isolamento EIEC	+
L115							
L173							
L381							
L447							
L469							
L491							
L547							
L718							
L854							
L864							
L910							

5.3. Valutazione della performance dei laboratori

La performance analitica dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità, secondo i criteri riportati al paragrafo 4.5.

La Figura 1 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti, evidenziando con diversi colori i punti assegnati per i risultati sbagliati e quelli per i test non effettuati.

La Figura 2 mostra il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto. Tre Laboratori hanno conseguito un punteggio uguale o superiore a 8, e la loro performance è stata considerata non adeguata.

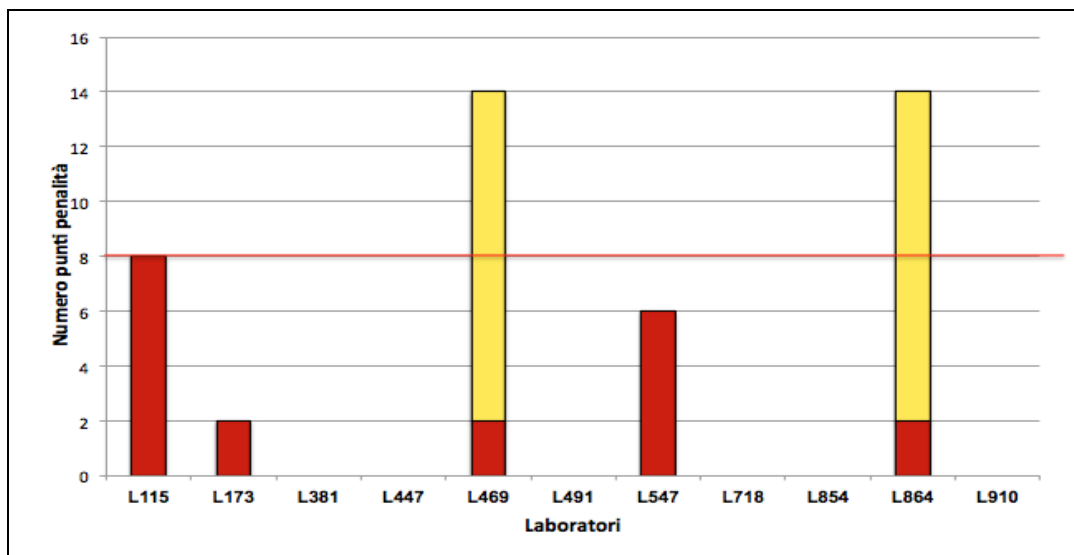


Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. I punti assegnati per risultati non corretti nella fase di screening e per mancato isolamento dei ceppi sono marcati in rosso; quelli assegnati per test non eseguiti in giallo. Per punteggi uguali o superiori a 8 la performance del laboratorio è stata considerata non adeguata.

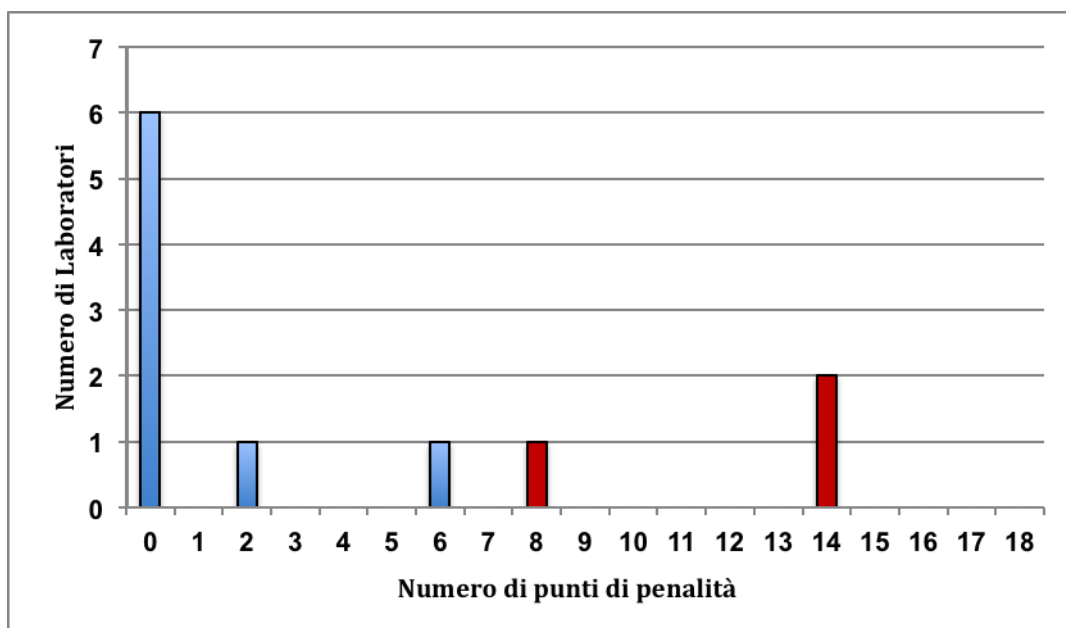


Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori: numero di laboratori per punteggio. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

6. Considerazioni

1. Lo studio è stato condotto su germogli, poiché il Reg. (EU) No 209/2013 ha recentemente introdotto per questa matrice un criterio microbiologico che prevede l'assenza di VTEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4. Come prescritto dal Regolamento, il metodo usato per la ricerca dei VTEC è stato lo standard ISO/TS 13136:2012.
2. Undici laboratori, afferenti a 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali, hanno partecipato allo studio. Tutti i laboratori hanno effettuato la ricerca dei VTEC, identificando correttamente il campione contaminato. Due laboratori non hanno tuttavia effettuato il successivo isolamento del ceppo di VTEC O157 dalla coltura di arricchimento PCR-positiva. Questo risultato indica che la maggior parte dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti in Italia sono in grado di applicare correttamente il metodo ISO/TS 13136:2012 per la ricerca dei VTEC negli alimenti.
3. Questo PT è stato esteso per la prima volta alla ricerca negli alimenti di ceppi appartenenti ad altri gruppi di *E. coli* patogeni, che sono stati associati in misura crescente a casi sporadici ed episodi epidemici di infezioni di origine alimentare nei paesi industrializzati. Otto laboratori hanno identificato correttamente il campione contaminato dal ceppo EIEC e 6 hanno isolato il ceppo dalla coltura di arricchimento PCR-positiva.
4. Nei precedenti studi, la performance dei laboratori è stata valutata determinando il valore del Kappa di Cohen. In questo PT, la performance è stata valutata in maniera più puntuale, assegnando punti di penalità per i risultati non corretti. Il punteggio ricavato è stato utilizzato per identificare i Laboratori e gli aspetti analitici da migliorare.



12th inter-laboratory study on the detection of Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) and other pathogenic *E. coli* in sprouts (PT12)

Laboratory Guideline

The **12th inter-laboratory study** (PT12) among the National Reference Laboratories (NRLs) for *E. coli* in the EU Member States and other European countries is dedicated to the detection and isolation of VTEC, as well as other *E. coli* strains belonging to patho-groups other than VTEC, in sprout samples. The patho-groups other than VTEC object of this study are: Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and Enteroinvasive *E. coli* (EIEC).

1. Treatment of the samples

The samples are constituted by 25 g of sprouts placed in stomacher bags with filters. Assuming that the bacteria in the sprout samples may have undergone stressing conditions, the enrichment medium will be buffered peptone water (BPW).

The samples are therefore added with 225 ml BPW directly in the stomacher bag, and homogenised in a stomacher peristaltic blender. The enrichment cultures are then incubated for 18-24 hrs at 37 °C (either static or in agitation).

2. Detection of the presence of pathogenic *E. coli* strains in the enrichment cultures by Real Time PCR amplification of their target virulence genes

One ml aliquot of the enrichment cultures is taken at this stage and used for DNA extraction and purification, according to the ISO/TS 13136:2012. The remaining culture shall be stored at +4 °C for the isolation steps that will follow a positive PCR result.

2.1. Detection of the presence of VTEC belonging to serogroups O157, O111, O26, O103, O145, and O104.

This part of the test will be performed according to the 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.

The detection of VTEC O104 will be carried out according to the adaptation provided by the EU-RL VTEC (available in the EU-RL web site, <http://www.iss.it/vtec>, Laboratory Methods Section - EU-RL_VTEC_Method_04_Rev1).

2.2. Detection of the presence of pathogenic *E. coli* strains other than VTEC

If the sample is negative for the presence of *vtx* genes, it will be tested for the following target genes:

- *aaiC* and *aggR* for **EAggEC**
- *lt*, *sth*, and *stp* for **EETEC**
- *ipaH* for **EIEC**

The Real Time PCR procedures for the detection of these target genes are available in the EU-RL web site (<http://www.iss.it/vtec>), Laboratory Methods Section.

In particular the procedure for:

aaiC and *aggR* genes detection is the EU-RL_VTEC_Method_05_Rev1;

lt, *sth*, and *stp* genes detection is the EU-RL_VTEC_Method_08_Rev0;

ipaH gene detection is the EU-RL_VTEC_Method_07_Rev0.

3. Isolation and identification of the pathogenic *E. coli* strains responsible for the positive PCR screening reactions

The enrichment cultures positive at the Real Time PCR screening step will be subjected to the isolation of the *E. coli* strains responsible for the positive PCR.

This will be accomplished by streaking the enrichment culture on suitable solid media (MacConkey agar plates or other media for *E. coli* isolation, such as TBX) and testing up to 50 colonies with typical *E. coli* morphology for the presence the virulence genes detected in the enrichment cultures. This can be achieved by testing pools consisting of 10 colonies each. Should a pool result positive in PCR tests, go back to test the single

colonies of the pool to identify the one(s) containing the gene(s). If the Real Time PCR screening step of the ISO/TS 13136:2012 indicated the presence of a given VTEC serogroup, the isolation can be facilitated by an immuno-magnetic separation step, specific for that serogroup.

The VTEC strains isolated will be characterized by determining the presence of *vtx1*, *vtx2*, and *eae* genes and the serogroup. For the strains belonging to the other patho-groups the determination of the presence of the target virulence genes will be sufficient.