



**Risultati del 14° test inter-laboratorio nazionale (PT14) per l'identificazione
della presenza di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC)
in campioni di germogli - 2014**

A cura di:

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

1. INTRODUZIONE

Il Regolamento (UE) No. 209/2013 sui criteri microbiologici applicabili ai germogli destinati al consumo umano diretto, ha introdotto per la prima volta un criterio microbiologico relativo ai VTEC. Il Regolamento prevede infatti l'assenza di VTEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 in 25 g di prodotto e prescrive per la loro ricerca l'uso del metodo ISO/TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'*EU Reference Laboratory for E. coli* (EU-RL VTEC) per rilevare la presenza di VTEC O104:H4.

Il metodo ISO/TS 13136:2012 è stato già impiegato nei sei precedenti studi inter-laboratorio sulla ricerca nei VTEC negli alimenti organizzati tra il 2008 e il 2013 dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, l'ultimo dei quali (PT12) è stato condotto proprio sui germogli. Anche il settimo PT sugli alimenti (PT14) ha riguardato questa matrice e la scelta è dovuta alle seguenti ragioni:

- I germogli sono un alimento pronto al consumo che continua a essere associato a focolai epidemici di infezione da Salmonella e VTEC.
- Il Regolamento (EU) 209/2013, in vigore dal 1° Luglio 2013, richiede che i laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti abbiano il metodo ISO TS 13136:2012 accreditato e siano pronti ad analizzare i germogli per la presenza di VTEC.

Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferimento (EU-RL) per questo microrganismo, 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 40 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare. Il report dello studio europeo è disponibile al sito web dell'EU-RL

(http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT14_EU.pdf).

2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

L'obiettivo dello studio è stato quello di accrescere l'esperienza dei laboratori nell'uso del metodo molecolare standard per la ricerca dei VTEC e, in particolare, migliorare il loro livello di preparazione nell'analisi dei germogli, una matrice per cui il Reg. (UE) 209/2013 ha stabilito un criterio microbiologico specifico per i VTEC.

3. PARTECIPANTI

Al PT hanno aderito i 18 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti di seguito elencati, afferenti a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) e alla ASL della Provincia di Lecco.

- Laboratorio di Prevenzione, ASL Provincia di Lecco, Oggiono (LC)
- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Igiene delle tecnologie alimentari e dell'alimentazione animale, Teramo
- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZS Puglia e Basilicata, Sezione di Putignano (BA)
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Roma
- IZS del Mezzogiorno, UO Microbiologia Alimentare, Sezione di Salerno, Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O.S. "Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM", Portici (NA)
- IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Torino
- IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Sezione di Genova
- IZS della Sicilia, Area Microbiologia degli Alimenti, Palermo
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo (FM)
- IZS Umbria Marche, Sezione di Pesaro
- IZS delle Venezie, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, SC Analisi del rischio e sorveglianza in sanità pubblica, Legnaro (PD)

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I germogli utilizzati nello studio erano una miscela commerciale confezionata per la vendita 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 potenzialmente contaminati con VTEC.

La contaminazione artificiale dei campioni, contenuti in sacchetti da *stomacher*, è stata effettuata il 21 Novembre 2014 utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale del ceppo di VTEC O104 descritto nella Tabella 1. Il valore dell'incertezza di misura associata all'inoculo utilizzato, calcolato secondo la norma ISO/TS 19036:2006, era 0,125 log CFU. I campioni sono stati preparati con tre diversi livelli di contaminazione: zero, basso (vicino al limite di rilevabilità stimato per la fase di isolamento del metodo) e alto; essi contenevano rispettivamente 0, 100 (75-130) e 1000 (750-1330) CFU per grammo di germogli del ceppo VTEC. Il titolo dell'inoculo è stato verificato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey.

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)	Livello di contaminazione nel:		
	Campione A	Campione B	Campione C
VTEC O104 (<i>vtx1+</i> , <i>vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>fliCH4-</i> , <i>aggR-</i> , <i>aaIC-</i>)	Alto: 1.000 (750-1.330) CFU/g	Basso: 100 (75-130) CFU/g	Zero

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 9 Ottobre 2014 con le stesse procedure utilizzate successivamente per la preparazione dei campioni da impiegare nel test. I campioni sono stati conservati a 4 °C e analizzati mediante Real Time PCR dopo 4, 6 e 11 giorni dalla preparazione, sempre ottenendo i risultati attesi.

Per la verifica dell'omogeneità, 10 repliche di ognuna delle tre aliquote test spedite ai laboratori 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) 209/2013, ai laboratori partecipanti è stato chiesto di ricercare la presenza di VTEC O157, O111, O26, O103, O145 e O104:H4, utilizzando lo standard ISO/TS 13136:2012 e la procedura prodotta dall'EU-RL per *E. coli* per la ricerca di VTEC O104:H4 (disponibile su 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.

Le procedure sopra menzionate sono anche state indicate per isolare e caratterizzare i ceppi VTEC responsabili delle reazioni PCR positive.

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 nella fase di screening delle colture di arricchimento mediante Real Time PCR

La *performance* nell'identificazione dei geni di virulenza e sierogruppo-associati è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per ogni risultato errato o mancante.

4.5.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'isolamento e la caratterizzazione dei ceppo VTEC O104

La *performance* è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo VTEC O104 dal campione A (alto livello di contaminazione) e per ogni risultato errato o mancante nella sua caratterizzazione. Non sono stati invece assegnati punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo VTEC O104 dal campione B (basso livello di contaminazione), in quanto il livello era vicino al limite di rilevabilità stimato per il metodo.

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, un punteggio superiore a 8 punti ha identificato una performance non adeguata.

5. RISULTATI

I campioni, inviati il 24 Novembre, sono stati recapitati a 13 Laboratori entro 24 ore e a 5 laboratori entro 48 ore. Le temperature all'arrivo riportate erano comprese tra 2 °C e 8 °C per 15 laboratori e tra da 14 °C e 16 °C per gli altri tre.

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 i 18 Laboratori partecipanti allo studio hanno effettuato la ricerca dei geni di virulenza associati ai VTEC (*vtx1*, *vtx2* ed *eae*), riportandone correttamente la presenza/assenza in tutti i campioni.

Sedici laboratori (89 %) hanno identificato correttamente la presenza del gene marcatore del sierogruppo O104 in entrambi i campioni contaminati, mentre i rimanenti due Laboratori hanno riportato un risultato falso negativo per questo specifico gene target.

Tabella 2. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati o mancanti.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza e sierogruppo-associati nel:											
	Campione A (alto livello di contaminazione)				Campione B (basso livello di contaminazione)				Campione C			
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>wzx_{O104}</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>wzx_{O104}</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>wzx_{O104}</i>
Valore atteso	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
L117												
L214												
L235												
L237												
L250												
L256												
L320												
L321				-				-				
L343												
L369												
L492												
L502												
L688												
L689												
L707				-				-				
L759												
L843												
L904												

5.2. Isolamento del ceppo VTEC O104 dai campioni PCR-positivi

La Tabella 3 riporta i risultati dell'isolamento del ceppo VTEC O104 dalle colture di arricchimento PCR-positive. L'isolamento è stato ottenuto correttamente da entrambi i campioni A e B da 16 laboratori (89 %). Per quanto riguarda la caratterizzazione dei ceppi isolati, 2 laboratori non hanno effettuato la ricerca del gene associato con l'antigene flagellare H4 (*fliCH4*), che è invece prevista dal Reg. (EU) 209/2013.

Solo 4 laboratori hanno condotto la ricerca dei geni marcatori dell'adesione entero-aggregativa (*aaiC* e *aggR*) nei ceppi isolati. Ai laboratori che non hanno effettuato questi test non sono stati assegnati punti di penalità, in quanto questo saggio non è previsto dal Reg. (EU) 209/2013 e non era stato esplicitamente richiesto nello schema dello studio PT.

Tuttavia, i laboratori dovrebbero tener presente l'opportunità di testare per la presenza di questi geni ogni ceppo VTEC di sierogruppo O104 isolato da alimenti.

Tabella 3. Isolamento e genotipizzazione dei ceppi VTEC dalle colture di arricchimento PCR-positive. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse il mancato isolamento o i risultati della genotipizzazione sbagliati o mancanti. ND indica che il test corrispondente non è stato effettuato.

Lab	Isolamento e genotipizzazione di ceppi VTEC da:										Campione C
	Campione A					Campione B					
	Isolamento VTEC O104	Genotipo				Isolamento VTEC O104	Genotipo				
		<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>fliCH4</i> (H4)	<i>aaiC</i> e/o <i>aggR</i>		<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>fliCH4</i> (H4)	<i>aaiC</i> e/o <i>aggR</i>	
Valore atteso	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
L117											
L214											
L235											
L237											
L250											
L256											
L320				ND					ND		
L321											
L343											
L369											
L492											
L502											
L688											
L689				ND					ND		
L707											
L759											
L843											
L904											

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 errati o mancanti riportati per fase di screening in Real Time PCR e in quella di isolamento e caratterizzazione dei ceppi VTEC

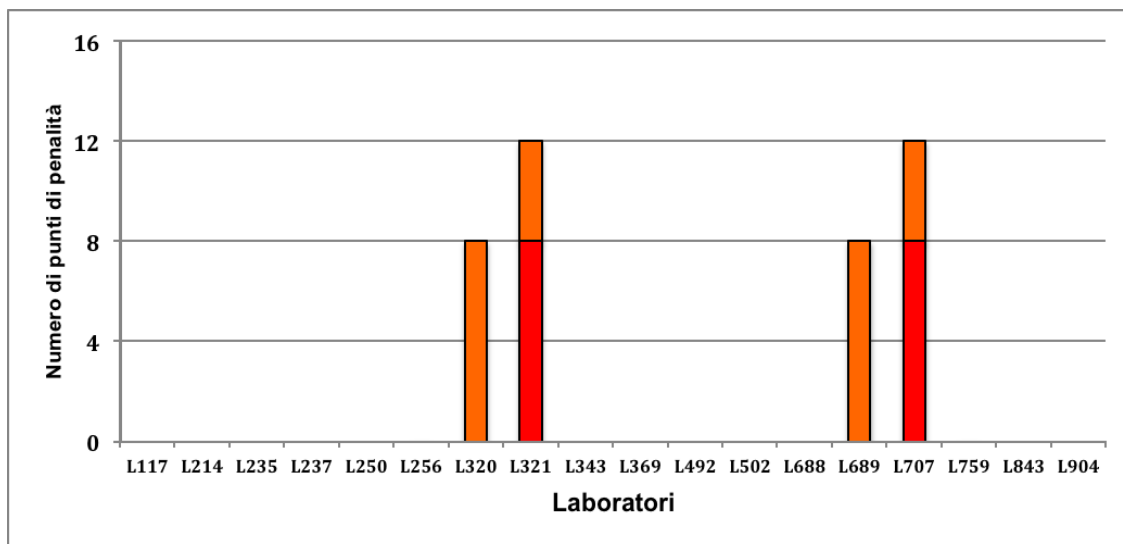


Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. I punti assegnati per risultati errati o mancanti nella fase di screening mediante Real Time PCR sono marcati in rosso, quelli assegnati per la fase di isolamento e caratterizzazione dei ceppi VTEC in giallo. La performance dei laboratori è stata considerata non adeguata per punteggi superiori a 8.

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

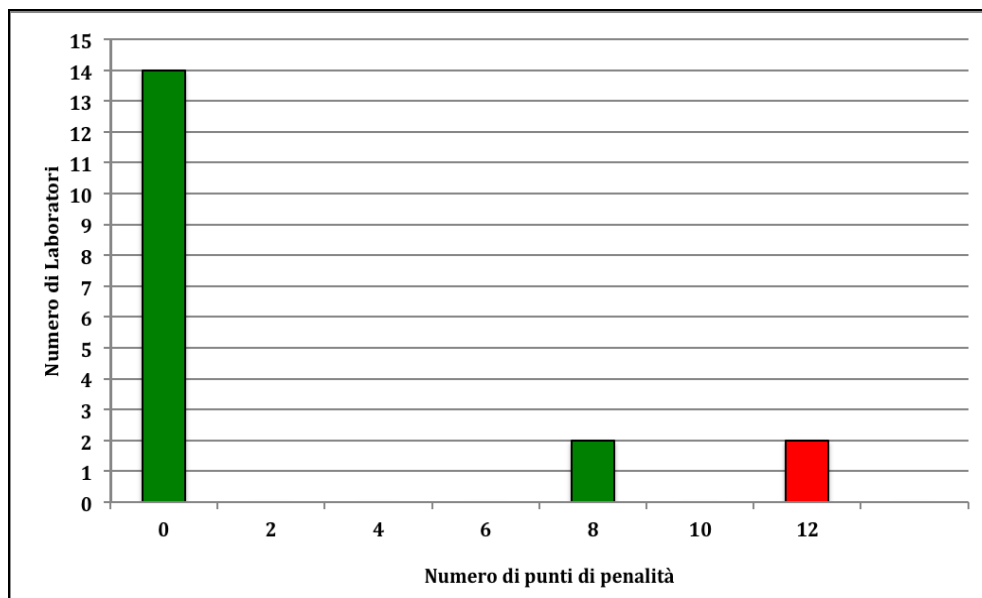


Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori: numero di laboratori per punteggio. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. Le barre rosse indicano i laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

6. CONSIDERAZIONI

Come per il PT12, la matrice scelta per il PT14 era costituita da germogli destinati al consumo umano diretto. Il Reg. (EU) 209/2013 ha infatti introdotto per i germogli un criterio microbiologico che prevede l'assenza di VTEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 e i laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti devono essere preparati a testare questa matrice secondo quanto prescritto. In accordo col Regolamento 209/2013, il metodo utilizzato nel PT per la ricerca dei VTEC è stato lo standard ISO/TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'EU-RL VTEC per la rilevare la presenza di VTEC O104:H4.

I campioni sono stati contaminati con un ceppo di VTEC O104, un sierogruppo incluso per la prima volta in un PT sulla ricerca di VTEC negli alimenti, utilizzando due livelli di contaminazione, il più basso dei quali prossimo al limite di rilevabilità stimato per la fase di isolamento del metodo. L'analisi dei risultati ha indotto le seguenti considerazioni:

1. Al PT hanno partecipato 18 laboratori, afferenti a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali e a una ASL.
2. Nella fase di screening mediante Real Time PCR, 16 laboratori (89 %) hanno identificato correttamente la presenza di VTEC O104 nei campioni contaminati.
3. Gli stessi 16 laboratori hanno anche ottenuto l'isolamento del ceppo VTEC O104 da entrambi i campioni contaminati, anche se due di essi non hanno saggiato il ceppo isolato per la presenza del gene *fliCH4* associato all'antigene flagellare H4, come invece prescritto dal Reg. (EU) No 209/2013.
4. La maggior parte dei laboratori non ha completato la caratterizzazione del ceppo isolato saggiando la presenza dei geni *aaIC* e *aggR*, associati all'adesione entero-aggregativa, caratteristica dei ceppi altamente patogeni O104:H4. Per questa mancanza non sono stati assegnati punti di penalità, poiché l'adesione entero-aggregativa non è considerata dal Reg. (EU) No 209/2013 e non era esplicitamente richiesta nello schema del PT. Tuttavia, i laboratori dovrebbero tener presente che ogni ceppo di VTEC O104 isolato da alimenti dovrebbe essere esaminato per questi geni.
5. Nel complesso, i risultati dello studio indicano che in Italia esiste un numero elevato di laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, distribuiti sulla maggior parte del territorio nazionale, in grado di effettuare correttamente la ricerca dei VTEC nei germogli secondo quanto previsto dal Reg. (EU) No 209/2013.