



**Risultati del 17° test inter-laboratorio nazionale (PT17)
sull'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*
produttori di Shiga tossina (STEC)
in campioni di alimenti - 2016**

A cura di:

*Silvia Arancia, Susan Babsa, Gianfranco Brambilla, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Fabio Galati,
Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Stefano Morabito, Concetta Scalfaro, Rosangela Tozzoli*

1. INTRODUZIONE

L'organizzazione di studi inter-laboratorio per valutare le prestazioni analitiche dei Laboratori Ufficiali degli Stati Membri rappresenta uno dei compiti principali dei Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR). Il LNR per *Escherichia coli*, inclusi gli *E. coli* produttori di Shiga tossina (STEC), presso l'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato numerosi studi inter-laboratorio o Proficiency Test (PT), sull'identificazione di STEC in matrici complesse, quali gli alimenti, e la caratterizzazione dei ceppi isolati.

Il metodo ISO/TS 13136:2012 rappresenta lo standard internazionale per l'identificazione di STEC negli alimenti ed è stato impiegato in nove studi inter-laboratorio organizzati tra il 2008 e il 2015 dal LNR per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità: PT3, condotto su tamponi di carcasse bovine; PT4 su campioni di latte; PT7 sugli spinaci; PT8 su campioni di acqua; PT9 su semi destinati alla produzione di germogli; PT12, PT14 e PT15 su campioni di germogli, e PT16 sulla determinazione di STEC in campioni di acqua di germogliatura. Le analisi dei risultati degli studi precedenti sono disponibili sul sito del LNR (www.iss.it/coli) nella sezione "Circuiti interlaboratoriali".

Il presente report riguarda il 10° studio sulla identificazione di STEC negli alimenti, in particolare in carne bovina macinata (PT17), basato sull'applicazione del metodo ISO/TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'*EU Reference Laboratory for E. coli* (EURL-VTEC) per rilevare la presenza di STEC O104:H4 (disponibile online nella sezione "Laboratory Methods" del sito dell'EURL).

La scelta di questa particolare matrice si basa sulle seguenti considerazioni:

- I bovini rappresentano il serbatoio principale degli STEC e la carne bovina è un alimento tradizionalmente associato all'infezione da STEC.
- La carne bovina macinata è stata riconosciuta quale veicolo di infezione da STEC in numerose epidemie, tra le quali anche quella avvenuta negli anni '80 in USA, quando il ceppo STEC O157 fu identificato per la prima volta.
- Sebbene non siano stati stabiliti criteri microbiologici per tale matrice alimentare, la carne bovina è sempre più frequentemente saggiata per la presenza di STEC nei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.
- Questa matrice non era stata mai oggetto degli studi inter-laboratorio organizzati dal LNR per *E. coli*.

Poiché il LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferimento (EURL) 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 37 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare. Il report dello studio europeo è disponibile al sito web dell'EURL (<http://www.iss.it/vtec>) nella sezione "Proficiency Tests".

2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Lo studio consisteva nell'identificazione e isolamento di STEC da campioni di carne bovina macinata contaminati con diverse quantità di un ceppo STEC O91. Questo sierogruppo non appartiene ai cosiddetti sierogruppi STEC *top-five*, ma è stato isolato da campioni di carne ed è il sesto sierogruppo tra quelli maggiormente riportati come causa di infezione umana in Europa nel periodo 2012-2014 (*EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2015*)

Gli **obiettivi** del PT17 erano:

- accrescere l'esperienza dei laboratori nell'applicazione del metodo standard ISO/TS 13136:2012 per la ricerca degli STEC e, in particolare, migliorare il loro livello di preparazione nell'analisi di campioni alimentari;
- accrescere il livello di preparazione dei laboratori nell'identificazione e l'isolamento di ceppi STEC che non appartengono ai cinque sierogruppi più frequenti;
- fornire ulteriore supporto ai LNR e Laboratori Ufficiali nell'accreditamento del metodo ISO TS 13136:2012.

3. PARTECIPANTI

Al PT17 hanno aderito 18 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, di seguito elencati. I laboratori afferivano a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) e alla ASL della Provincia di Lecco.

- ASL Provincia di Lecco, Laboratorio di Prevenzione, 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, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Sezione di Genova
- IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo (FM)
- IZS Umbria e 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

Ai laboratori sono stati inviati tre campioni (A, B e C), costituiti da 25 g di carne bovina macinata potenzialmente contaminati con STEC. La carne era stata acquistata il 29 Marzo 2016 e consisteva in un singolo taglio di carne bovina, macinata come primo processo del giorno stesso dell'acquisto per evitare la contaminazione con altri tagli di carne. La carne macinata presentava una flora microbica naturale (circa 1.4×10^4 CFU/g). All'arrivo in laboratorio, la carne è stata suddivisa in porzioni da 25 g in buste *stomacher* sterili conservate a -20 °C fino al momento della preparazione dei campioni del PT. Due porzioni da 25 g sono state saggiate per la presenza di STEC applicando il metodo ISO/TS 13136:2012 e sono risultate negative per i geni *stx1* ed *stx2*.

La contaminazione artificiale dei campioni, direttamente nei sacchetti da *stomacher*, è stata effettuata il 15 Aprile 2016, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale di crescita ($OD_{600} = 0,5$) del ceppo di STEC O91 descritto nella Tabella 1. Il valore dell'incertezza di misura associata all'inoculo utilizzato, calcolato secondo la norma ISO/TS 19036:2006, era 0,121 log UFC/ml.

I campioni sono stati preparati con tre diversi livelli di contaminazione: zero, bassa carica e alta carica e contenevano rispettivamente 0, 5 e 50 UFC per grammo del ceppo STEC O91. Il titolo dell'inoculo è stato verificato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey. La concentrazione dell'analita nei campioni è stata stabilita sulla base dei risultati dei test di stabilità (screening mediante Real Time PCR e isolamento) condotti nell'arco di 12 giorni dalla contaminazione di porzioni di carne macinata.

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

Tabella 1. Caratteristiche dei campioni di carne macinata utilizzati nello studio

Contaminante (Genotipo)	Livello di contaminazione nel:		
	Campione A	Campione B	Campione C
Ceppo ED 76, STEC O91* (<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>eae-</i>)	-	Basso: 5 UFC/g	Alto: 50 UFC/g

*L'incertezza di misura associata all'inoculo del ceppo ED 76 è pari a 0.121 log CFU/ml.

I campioni, identificati con codici numerici assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio, sono stati trasferiti in contenitori di sicurezza refrigerati e spediti tramite corriere il 18 Aprile 2016. 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, sono stati preparati campioni contaminati con 10, 100, 500 e 1000 UFC/g del ceppo STEC O91 in quattro repliche, analizzate (Real Time PCR ed isolamento) dopo 0, 4, 7 e 12 giorni dalla preparazione, ottenendo sempre i risultati attesi fino all'isolamento del ceppo STEC da tutti i campioni analizzati.

Per la verifica dell'omogeneità, 6 sacchetti di ognuna delle tre aliquote test allestite per la spedizione ai laboratori sono state selezionate casualmente subito dopo la preparazione e analizzate il 17 e 18 Aprile, ottenendo i risultati attesi.

4.3. Metodi di laboratorio

Ai laboratori partecipanti è stato chiesto di identificare la presenza di STEC utilizzando lo standard ISO/TS 13136:2012 e la procedura prodotta dall'EURL per *E. coli* per la ricerca di STEC O104:H4 (disponibile su www.iss.it/vtec, sezione "*Laboratory Methods*").

4.4. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, utilizzando pagine dedicate accessibili attraverso la "*Restricted Area*" del sito web dell'EURL-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 rapporto di analisi, contenente 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 degli STEC nella fase di screening è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per ogni risultato errato o mancante circa l'identificazione dei geni *stx1* ed *stx2* nei tre campioni. Non sono stati assegnati punti di penalità in caso di identificazione dei caratteri *eae* e *wzx_{O26}*, in quanto l'analisi dei dati di questo studio, comprensivi dei risultati riportati dai LNR per *E. coli* degli Stati Membri della UE (www.iss.it/vtec, sezione "*Proficiency Tests*"), ha messo in luce la presenza di un ceppo EPEC O26 in alcune porzioni della carne utilizzata.

4.5.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'isolamento e la caratterizzazione del ceppo STEC O91

La *performance* è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo STEC O91 dal campione C (alto livello di contaminazione) e per ogni risultato errato nella sua caratterizzazione. Non sono stati invece assegnati punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo dal campione B (basso livello di contaminazione), in quanto il livello era vicino al limite di rilevabilità stimato per il metodo.

Non sono stati assegnati punti di penalità ai laboratori che non hanno identificato il sierogruppo del ceppo isolato (ONT), in quanto è fuori dallo scopo dei metodi indicati ai laboratori per questo studio. Tuttavia, nel caso di errata caratterizzazione del sierogruppo del ceppo isolato sono stati assegnati due punti di penalità.

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 soddisfacente.

5. RISULTATI

I campioni, inviati il 18 Aprile 2016, sono stati recapitati a 13 laboratori entro 24 ore ed a 5 laboratori entro 48 ore. La temperatura all'arrivo riportata era compresa tra 2 °C e 8 °C per 13 laboratori ed era tra 13°C e 16°C per i restanti laboratori.

I risultati sono stati inviati da tutti e 18 i laboratori.

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 dei 18 laboratori partecipanti allo studio. Il campione negativo (A) è stato identificato correttamente da tutti i laboratori.

Per quanto riguarda i campioni B (basso livello di contaminazione) e C (alto livello di contaminazione), 17 laboratori hanno riportato correttamente la presenza dei geni *stx1* ed *stx2*, mentre un partecipante non ha identificato la presenza del gene *stx1* in entrambi i campioni, ottenendo otto punti di penalità. Due laboratori hanno riportato la presenza del gene *eae* nel campione B, in un caso insieme alla identificazione del gene *wzx*_{O26}. Tre laboratori hanno identificato la presenza del gene *eae* nel campione C, in due casi unitamente al gene *wzx*_{O26}.

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 non corrispondenti al valore atteso.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza e sierogruppo-associati nel:										
	Campione A (negativo)			Campione B (basso livello di contaminazione)				Campione C (alto livello di contaminazione)			
	stx1	stx2	eae	stx1	stx2	eae	Geni associati ai sierogruppi Top-5 e O104	stx1	stx2	eae	Geni associati ai sierogruppi Top-5 e O104
Valore atteso	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
L203											
L219											
L341											
L480										+	O26
L555											
L557						+	O26			+	O26
L599											
L627											
L635											
L638											
L699											
L730				-				-			
L742											
L777											
L786											
L793						+				+	
L796											
L893											

5.2. Isolamento del ceppo STEC O91 dai campioni positivi in Real Time PCR

La Tabella 3 riporta i risultati dell'isolamento del ceppo STEC O91 dalle colture di arricchimento positive in Real Time PCR. Dodici laboratori (66,7 %) hanno ottenuto l'isolamento del ceppo STEC dal campione B (basso livello di contaminazione) e 13 (72,2 %) dal campione C (alto livello di contaminazione). Un laboratorio ha riportato l'assenza del gene *stx1* nei ceppi STEC isolati da entrambi i campioni, mentre gli altri laboratori hanno correttamente identificato i geni *stx1* ed *stx2* nel ceppo isolato. Quattro laboratori hanno identificato il ceppo isolato come O91 ed un laboratorio lo ha riportato erroneamente come O26 nel campione C, ottenendo due punti di penalità.

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 errati.

Isolamento e genotipizzazione di ceppi VTEC da:													
Lab	Campione A	Campione B								Campione C			
	-	Isolamento STEC O91	Genotipo			Isolamento altri <i>E. coli</i>	Genotipo			Isolamento STEC O91	Genotipo		
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
Valore atteso	None	+	+	+	-					+	+	+	-
L203													
L219													
L341													
L480		ND								O26			
L555													
L557		ND								ND			
L599		ND								ND			
L627		ONT								ONT			
L635		ONT								ONT			
L638		ONT				O26	-	-	+	ONT			
L699		ONT								ONT			
L730		ONT	-							ONT	-		
L742		ONT								ONT			
L777		ND								ND			
L786	O26, eae+	ONT								ONT			
L793		ND								ND			
L796		ND								ND			
L893		ONT								ONT			

Due laboratori hanno riportato l'isolamento di un ceppo EPEC O26 nel campione A (L786) e nel campione B (L638). Come già osservato nel corso delle analisi dei risultati di questo studio riportati dai LNR per *E. coli* degli Stati Membri della UE (www.iss.it/vtec, sezione "Proficiency Tests"), un ceppo EPEC O26 era presente, come microflora contaminante della carne utilizzata per questo studio, in maniera non omogenea nelle porzioni preparate in laboratorio. Questo chiarisce anche la presenza dei numerosi segnali relativi ai geni *eae* ed *wzx_{O26}* riportati nella fase di screening e per i quali non sono stati infatti assegnati punti di penalità in quanto non considerati errati, nonostante differenti dal valore atteso.

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 totali ottenuti dai laboratori partecipanti, relativi ad entrambe le fasi di screening ed isolamento.

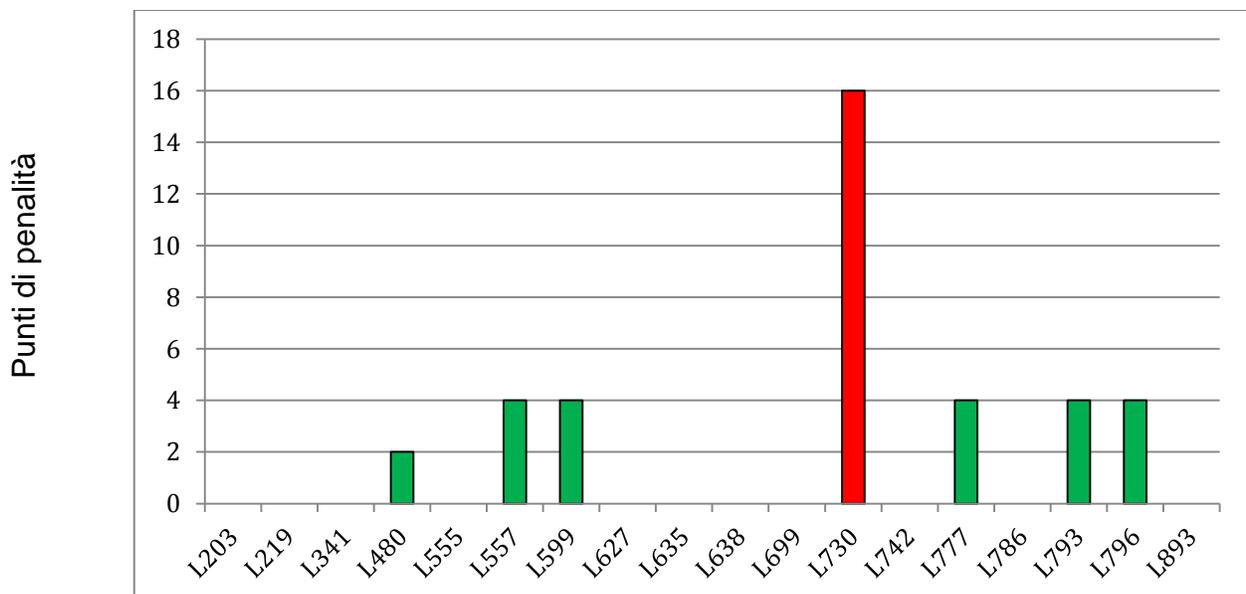


Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. La performance dei laboratori è stata considerata non adeguata per punteggi superiori a 8.

La Figura 2 mostra il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto. Un solo laboratorio ha conseguito un punteggio superiore a 8, mentre gli altri 17 laboratori hanno mostrato una performance soddisfacente.

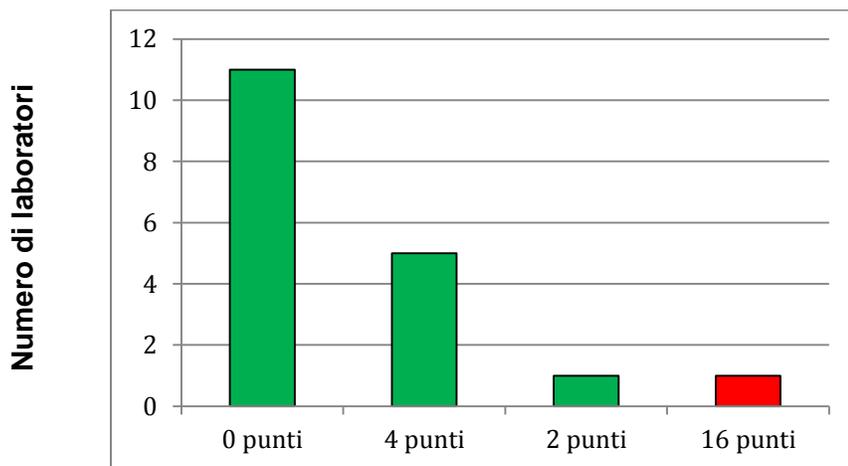


Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori: numero di laboratori per punteggio. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. Le barre verdi indicano i laboratori la cui performance è stata considerata adeguata.

6. CONSIDERAZIONI

Il PT17 aveva come obiettivo principale accrescere l'esperienza dei laboratori nell'applicazione del metodo standard ISO/TS 13136:2012 per la ricerca degli STEC negli alimenti. In particolare, lo studio ha previsto l'analisi di carne bovina macinata, tradizionalmente associata alle infezioni da STEC, contaminata per la prima volta con un ceppo STEC O91 *stx1 stx2*, quindi non appartenente ai 5 sierogruppi principali né al sierotipo O104:H4.

L'analisi dei risultati ha indotto le seguenti considerazioni:

1. Diciotto laboratori hanno partecipato allo studio, afferenti a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali ed a una ASL, e tutti hanno inviato regolarmente i risultati.
2. Nella fase di screening mediante Real Time PCR, tutti i 18 laboratori (100 %) hanno identificato la presenza di STEC, nonostante un laboratorio non sia stato in grado di identificare entrambi i geni *stx*. Tredici laboratori (72,2 %) hanno ottenuto l'isolamento del

ceppo STEC O91 dal campione contenente un'alta carica di ceppo STEC contaminante e 12 dal campione con bassa carica (66,7 %).

3. Nella carne utilizzata come matrice dello studio inter-laboratorio era presente un ceppo EPEC O26, non omogeneamente distribuito nelle porzioni da saggiare, che ha dato luogo ad alcune positività in Real Time PCR ai geni *eae* e *wzx_{O26}*. Non sono stati assegnati punti di penalità ai laboratori che hanno riportato tali positività.
4. Diciassette dei 18 laboratori partecipanti hanno mostrato una performance soddisfacente. L'unico laboratorio che non ha ottenuto tale risultato ha mostrato una difficoltà nell'identificazione del gene *stx1*.
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 STEC negli alimenti.