



**Risultati del 19° test inter-laboratorio nazionale (PT19)
per l'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*
produttori di Shiga-tossina (STEC)
in campioni di acqua di germogliazione - 2017**

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

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 agli *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina (STEC). Il Regolamento prevede l'assenza di STEC 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'*European Union Reference Laboratory for E. coli* (EURL-VTEC) per rilevare la presenza di VTEC O104:H4.

Il Reg. (EU) 209/2013 dà anche la possibilità agli operatori del settore di sostituire campionamento e analisi dei germogli saggiando campioni rappresentati ognuno da 200 ml di acqua utilizzata per l'irrigazione dei germogli. Tuttavia, l'analisi dell'acqua di germogliazione per l'identificazione di STEC presenta delle difficoltà legate alle caratteristiche di questa matrice come, ad esempio, l'elevata densità che rende particolarmente problematica la concentrazione di STEC mediante filtrazione.

Nell'ambito dei suoi compiti, l'EURL-VTEC mette a punto e rende disponibili metodi per l'identificazione degli STEC e, in questo caso, ha sviluppato una procedura semplice di pre-trattamento dell'acqua di germogliazione, basata sulla centrifugazione dei campioni e risospensione del pellet in Acqua Peptonata Tamponata, per effettuare l'arricchimento e le successive fasi analitiche indicate nella ISO/TS 13136:2012. Questa procedura è stata valutata nell'ambito di uno studio inter-laboratorio, il PT16, organizzato nel 2015. Il PT16 ha visto la partecipazione di 51 Laboratori, tra i quali 34 Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) e 17 Laboratori italiani coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti. Lo studio prevedeva l'analisi di tre campioni di acqua di irrigazione utilizzata nella germogliazione di semi, contaminati rispettivamente con 0, 20 e 500 UFC/ml di un ceppo STEC O157, applicando la procedura di pre-trattamento messa a punto dall'EURL-VTEC. I risultati dello studio sono stati soddisfacenti e hanno permesso di valutare la procedura di pre-trattamento dell'acqua di germogliazione come uno strumento efficace per valutare la conformità dei germogli relativamente al criterio microbiologico indicato nel Reg. (EU) 209/2013.

Nel 2017, l'EURL-VTEC ha organizzato un secondo studio inter-laboratorio, PT19, su questa matrice per valutare la capacità degli NRL nell'identificare la presenza di STEC non-O157 in campioni di acqua di germogliazione. Tale studio inoltre aveva come obiettivo Report del PT19, 25/08/2017



un'ulteriore valutazione della procedura sviluppata per il trattamento dell'acqua di germogliazione in presenza di campioni contaminati con STEC non-O157.

Poiché l'EURL-VTEC è anche LNR 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 30 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare. Il report dello studio europeo è disponibile al sitoweb dell'EURL (<http://www.iss.it/vtec>) nella sezione *Proficiency Tests*. Questo report presenta i risultati dello studio nazionale PT19, condotto a beneficio dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.

2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT19 consisteva nell'identificazione e isolamento di un ceppo STEC mediante l'applicazione della procedura di pre-trattamento dell'acqua di germogliazione e nell'analisi dei campioni secondo quanto prescritto dalla ISO/TS 13136:2012.

Gli obiettivi dello studio erano:

- ottimizzare la procedura di pre-trattamento dell'acqua di germogliazione per l'identificazione di STEC;
- accrescere l'esperienza dei Laboratori nell'analisi dell'acqua di irrigazione utilizzata nella germogliazione dei semi, una matrice indicata nel Reg. (UE) 209/2013 che stabilisce un criterio microbiologico specifico per STEC;
- fornire un ulteriore supporto ai Laboratori Ufficiali per l'accreditamento della ISO/TS 13136:2012.

Lo studio ha previsto l'analisi di campioni di acqua di germogliazione contenenti diverse concentrazioni di un ceppo STEC che apparteneva ad uno dei sierogruppi inclusi nel criterio microbiologico fissato dal Reg. (EU) 209/2013. In particolare, i Laboratori che hanno accettato di partecipare al PT19, hanno ricevuto tre campioni di acqua di irrigazione, due dei quali contaminati con un ceppo STEC O145, uno ad alta carica e uno a bassa carica.



3. PARTICIPANTI

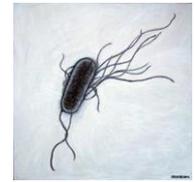
Al PT hanno aderito 15 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti di seguito elencati. I Laboratori afferivano a 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) ed a 2 Agenzie di Tutela della Salute (ATS), della Brianza e di Milano, rispettivamente.

- ATS della Brianza, Laboratorio di Prevenzione, Oggiono (LC)
- ATS della Città Metropolitana di Milano, Laboratorio di Prevenzione, Sezioni Biologia Molecolare e Microbiologia Clinica, Milano
- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Reparto Igiene degli Alimenti, Teramo
- 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 Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Roma
- IZS del Mezzogiorno, UO Microbiologia degli Alimenti, Sezione di Salerno, Fuorni (SA)
- 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 della Sicilia, Area Microbiologia degli Alimenti, Palermo
- IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS delle Venezie, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

L'acqua di germogliazione utilizzata in questo studio è stata fornita da un produttore locale di germogli. La raccolta è iniziata dopo 48 ore dall'inizio della produzione di germogli di ravanella, in accordo a quanto indicato nel Reg. (EU) 209/2013. L'acqua si presentava in forma semi-colloidale dovuta alle sostanze rilasciate dai semi nel corso della germogliazione, conteneva una flora di background pari a circa 5×10^6 CFU/ml e dall'analisi di due campioni da 200 ml risultava negativa per la presenza dei geni di virulenza e associati ai sierogruppi STEC indicati nel Reg. (EU) 209/2013, target di questo studio.



Ai Laboratori sono stati inviati tre campioni potenzialmente contaminati con STEC (1, 2 e 3), costituiti ciascuno da 200 ml di acqua in bottiglie di plastica sterili.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 31 Marzo 2017, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale (OD = 0,5 a 600 nm) del ceppo STEC O145 C1178-04, come descritto nella Tabella 1. Il valore dell'incertezza di misura associata all'inoculo utilizzato, calcolato secondo la norma ISO/TS 19036:2006, era 0,37 log UFC/ml.

I campioni sono stati preparati con tre diversi livelli di contaminazione: zero, bassa carica e alta carica; essi contenevano rispettivamente 0, 50 e 500 UFC del ceppo STEC per millilitro di acqua di germogliazione. Il titolo dell'inoculo è stato verificato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey. La concentrazione dell'analita nei campioni è stata decisa sulla base dei risultati dei test di stabilità condotti nell'arco di 11 giorni dopo la contaminazione dei campioni.

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 (<i>Genotipo</i>)	Livello di contaminazione:		
	Campione 1	Campione 2	Campione 3
STEC O145 (<i>stx1+</i> , <i>eae+</i>)	-	Bassa carica: 50 UFC/ml	Alta carica: 500 UFC/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 3 Aprile 2017. 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 con 20, 50, 100, 200 e 400 UFC/ml è stato preparato come descritto nel paragrafo precedente. 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 e i livelli di contaminazione finali sono stati stabiliti come 0, 50 and 500 UFC/ml per i tre campioni oggetto dello studio.

Per la verifica dell'omogeneità, 10 repliche di ognuna delle tre aliquote test allestite per la spedizione ai Laboratori sono state selezionate casualmente subito dopo la preparazione e analizzate, ottenendo i risultati attesi.

4.3. Metodi di laboratorio

La procedura indicata ai Laboratori partecipanti prevedeva i seguenti passaggi:

- centrifugazione dei campioni di acqua di irrigazione;
- trasferimento del pellet nel terreno di arricchimento (Acqua Peptonata Tamponata) nella proporzione $1/10 \text{ volume}_{\text{pellet}} \text{ o } \text{peso}_{\text{pellet}}/\text{volume}_{\text{terreno}}$;
- applicazione dello standard ISO/TS 13136:2012 e la procedura prodotta dall'EURL-VTEC per *E. coli* per la ricerca di VTEC O104:H4 (disponibile su www.iss.it/vtec, sezione *Laboratory Methods*);
- isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC identificato.

4.4. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I partecipanti hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando 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 *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 competenza dei Laboratori nell'identificazione dei geni *stx1* ed *stx2* nelle colture di arricchimento dei tre campioni è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per ogni risultato errato. Due punti di penalità sono stati assegnati ai risultati non corretti relativamente all'identificazione dei geni *eae* e *ihp*_{O145}.

La somma dei punti di penalità assegnati 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.

4.5.2. Valutazione della performance dei Laboratori nell'isolamento del ceppo STEC

La capacità dei Laboratori partecipanti di isolare e caratterizzare il ceppo STEC, contaminante due dei tre campioni analizzati, è stata valutata ma non sono stati assegnati punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo STEC, né nel campione a bassa carica né in quello ad alta carica. Infatti, i risultati raccolti nell'ambito del presente studio hanno mostrato serie difficoltà nell'isolare il ceppo STEC O145 come coltura pura. Questo dato è sovrapponibile a quanto emerso nell'analisi dei risultati del PT19 riportati dai LNR, nel quale solo circa il 22 % dei partecipanti è riuscito ad isolare il ceppo STEC O145 in entrambi i campioni contaminati (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT19_def.pdf).

5. RISULTATI

I campioni sono stati spediti a 15 Laboratori ufficiali, dei quali 14 hanno sottomesso i risultati (eccetto L806). I campioni sono stati spediti il 3 Aprile 2017 e ricevuti da otto Laboratori entro le 24 ore, da cinque entro 48 ore ed entro 72 ore dall'ultimo partecipante.

La temperatura alla quale i partecipanti hanno dichiarato di aver ricevuto i campioni variava tra 0 °C e 5 °C per nove Laboratori e tra 5 °C ed 8 °C per altri quattro Laboratori. Purtroppo uno dei partecipanti (L927) ha ricevuto i campioni a 10 °C (nonostante fossero stati consegnati entro le 48 ore) e, a causa della fuoriuscita del liquido da due delle bottiglie, ha potuto procedere con l'analisi del solo campione integro (Campione 3, alto livello di contaminazione).



5.1. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento

La Tabella 2 riporta i risultati della ricerca dei geni di virulenza nelle colture di arricchimento mediante Real-Time PCR.

Tutti i Laboratori ad eccezione di uno hanno identificato correttamente il Campione 1 come negativo. Il Laboratorio L425 ha invece riportato l'identificazione della presenza dei geni *stx1* ed *stx2* in questo campione.

Per quanto concerne il Campione 2, contaminato con bassa carica di STEC O145, sei dei 13 Laboratori che hanno condotto l'analisi (46,2 %) hanno identificato correttamente la presenza dei geni *stx1* ed *eae* e l'assenza del gene *stx2* (Tabella 2). I rimanenti sette Laboratori hanno riportato un totale di 9 errori nell'identificazione dei geni di virulenza. In particolare, cinque Laboratori non sono riusciti ad identificare la presenza del gene *stx1*, un altro ha riportato erroneamente la presenza del solo gene *stx2* in questo campione ed un ultimo non ha rilevato la presenza del gene *eae* (Tabella 2). I cinque Laboratori che non hanno identificato alcun gene *stx* in questo campione, non hanno effettuato il tentativo di isolamento, in quanto non sono riusciti a determinare la presenza di STEC. Un Laboratorio, L189, nonostante non avesse identificato la presenza di alcun gene *stx*, ha condotto l'analisi per l'identificazione del gene *eae* trovando il Campione 2 positivo per questo target (dato non mostrato nella Tabella 2). Quattro degli otto Laboratori che hanno eseguito l'analisi per l'identificazione dei geni associati ai sierogruppi top-5 e O104, hanno avuto successo nell'identificazione del gene *ihp1*_{O145} (Tabella 2).

Nel Campione 3, corrispondente all'alto livello di contaminazione, 13 dei 14 Laboratori (92,9 %) hanno identificato correttamente la presenza dei geni *stx1* ed *eae* e l'assenza di *stx2* (Tabella 2). Tuttavia tre non hanno identificato il gene *ihp1*_{O145}. Un Laboratorio, L425, non ha identificato la presenza di STEC nel campione.

In generale, molti Laboratori hanno riportato nel campo note che i valori di C_t osservati nella fase di screening erano molto elevati, suggerendo la presenza di poche cellule batteriche di STEC nelle colture di arricchimento.



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 errati. Le caselle bianche indicano che il test non è stato effettuato. ONT: O non tipizzabile (negativo per i geni associati ai sierogruppi STEC top-5 e O104)

Lab	Identificazione dei geni di virulenza e associati ai sierogruppi STEC top-5 e O104 nel:											
	Campione 1				Campione 2 Basso livello di contaminazione				Campione 3 Alto livello di contaminazione			
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ihp1_{O145}</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ihp1_{O145}</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ihp1_{O145}</i>
Valore atteso	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
L189					-							ONT
L202					-							
L283												
L300												
L317					-							
L339								ONT				
L425	+	+			-	+	-	ONT	-			
L657					-							
L664												
L795							-	ONT				
L807												
L814								ONT				ONT
L927	*	*	*	*	*	*	*	*				
L975					-							ONT

* Campioni non analizzati dal partecipante, in quanto le confezioni sono state ricevute non integre

5.2 Valutazione della *performance* dei Laboratori

La *performance* analitica dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità esclusivamente per i risultati relativi alla fase di screening, secondo i criteri riportati al paragrafo 4.5.

La Figura 1 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti, assegnati per i risultati non corretti riportati per la fase di screening delle colture di arricchimento mediante Real Time PCR.

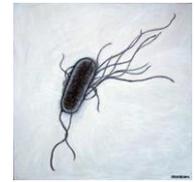
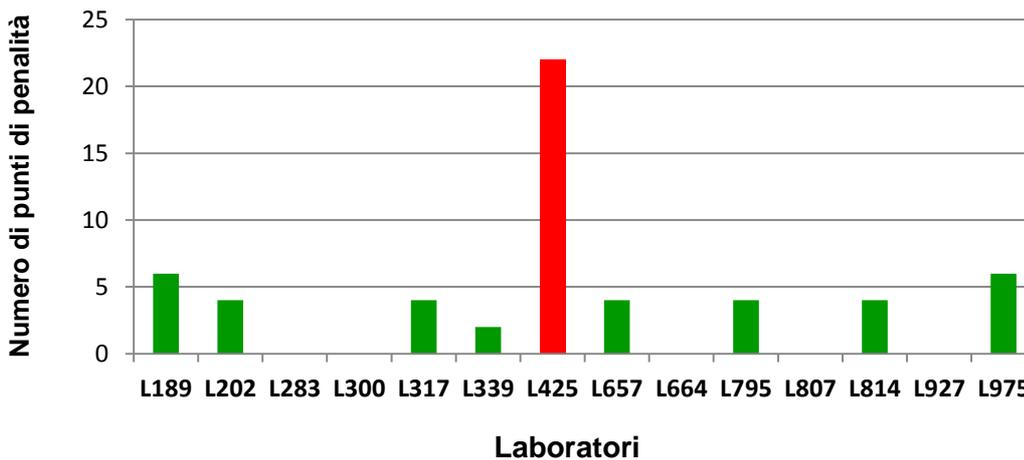
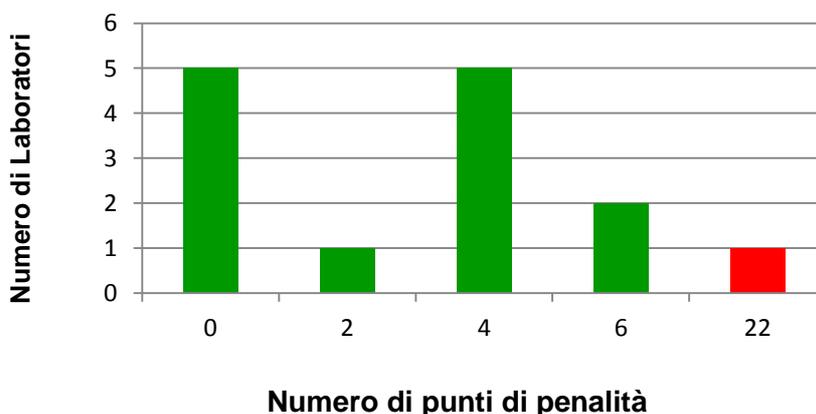


Figura 1. Valutazione della *performance* dei Laboratori nella fase di screening. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. La *performance* dei laboratori è stata considerata non adeguata per punteggi superiori a 8 (barra rossa).



La Figura 2 mostra il numero dei Laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto. Un solo Laboratorio ha conseguito un punteggio superiore a 8 (barra rossa).

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.





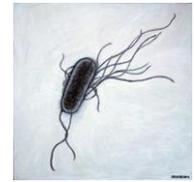
5.4. Isolamento del ceppo STEC O145 dai campioni positivi in Real Time PCR.

La Tabella 3 riporta i risultati dell'isolamento del ceppo STEC O145 dalle colture di arricchimento positive in Real Time PCR. Come mostrato, nessuno degli otto Laboratori partecipanti che avevano identificato la presenza di STEC nel Campione 2 (basso livello di contaminazione) è riuscito ad isolare il contaminante (Tabella 3). Un laboratorio, L807, ha riportato di aver testato più di 200 colonie per confermare la presenza di STEC, senza riuscirci. Nel campione 3 ad alta carica, tre dei 13 Laboratori (23,1 %) che avevano ottenuto risultati positivi per i geni *stx* nella fase di screening sono riusciti ad isolare il ceppo STEC O145 (Tabella 3). Questo risultato è sovrapponibile a quanto riportato dai LNR nel corso dello stesso studio (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT19_def.pdf).

Tabella 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC O145 nei campioni di acqua di germogliazione. Le caselle verdi indicano i risultati corretti, le caselle rosse il mancato isolamento. Infine, le caselle arancioni indicano che il tentativo di isolamento non è stato effettuato.

Isolamento e genotipizzazione di ceppi STEC da:									
Lab	Campione 1	Campione 2				Campione 3			
	-	Isolamento STEC O145	Genotipo			Isolamento STEC O145	Genotipo		
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
Valore atteso	None	+	+	-	+	+	+	-	+
L189		*							
L202		*							
L283									
L300									
L317		*							
L339									
L425						*			
L657		*							
L664									
L795									
L807									
L814									
L927									
L975		*							

* L'isolamento non è stato tentato in questi campioni in quanto non era stata rilevata la presenza di STEC nella fase di screening nelle relative colture di arricchimento



6. CONSIDERAZIONI

Il Reg. (EU) 209/2013 stabilisce come criterio microbiologico l'assenza di STEC O157, O26, O157, O103, O145 ed O104:H4 nei germogli, e indica la possibilità ai produttori di analizzare l'acqua di germogliazione per valutare la conformità del prodotto finale. Tuttavia, l'analisi dell'acqua di irrigazione utilizzata nelle fasi di germogliazione presenta delle difficoltà legate alle caratteristiche di questa matrice, quali la presenza non omogenea di particelle rilasciate dai semi e la sua consistenza semi-colloidale.

L'EURL-VTEC ha pertanto sviluppato una procedura semplice di pre-trattamento dell'acqua di germogliazione basata sulla centrifugazione del campione. Tale procedura era stata oggetto di valutazione nel corso del PT16 organizzato nel 2015, che prevedeva l'analisi di campioni di acqua di germogliazione contaminati con STEC O157 applicando tale procedura. I risultati ottenuti da 50 Laboratori che hanno partecipato al PT16 hanno mostrato che la procedura di pre-trattamento dell'acqua di germogliazione sviluppata dall'EURL-VTEC risultava efficace allo scopo, almeno per gli STEC O157, in quanto la presenza dei geni di virulenza del ceppo contaminante era stata identificata da 48 Laboratori (96 %) nel Campione A (alto livello di contaminazione) e da 47 Laboratori (94 %) nel Campione B (basso livello di contaminazione). L'isolamento del ceppo STEC O157 era stato eseguito con successo dall'88 % dei Laboratori nel Campione A e dall'84 % nel campione B. E' da notare, tuttavia, che per l'isolamento di STEC O157 è possibile applicare un'efficace separazione immuno-magnetica e utilizzare terreni di isolamento selettivi e differenziali, non disponibili per altri sierogruppi STEC.

Il PT19 aveva come obiettivi di valutare ulteriormente la procedura sviluppata per l'acqua di germogliazione e di accrescere l'esperienza dei Laboratori nell'analisi di questa matrice contaminata con un ceppo STEC non-O157. Il PT19 ha visto la partecipazione di 15 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, dei quali 14 hanno sottomesso i risultati. Il ceppo utilizzato nello studio era un ceppo STEC O145, contaminante i campioni alle seguenti concentrazioni: 0, 50 and 500 CFU/ml. I risultati riportati dai Laboratori partecipanti allo studio hanno mostrato difficoltà nell'identificazione del ceppo contaminante nella fase di screening del Campione 2 (basso livello di contaminazione), nel quale il 46 % dei Laboratori partecipanti non è stato in grado di identificare il gene *stx1*. Tuttavia, un solo Laboratorio partecipante ha riportato un totale di punti di penalità tali da superare 8, la soglia stabilita per valutare *performance* non soddisfacenti. Inoltre, i risultati Report del PT19, 25/08/2017



del PT19 condotto a livello nazionale ed europeo, hanno messo in evidenza una difficoltà significativa nell'isolamento di un ceppo STEC contaminante non appartenente al sierogruppo O157, indicando che la procedura necessita di essere perfezionata.