



**Risultati del 20° test inter-laboratorio nazionale (PT20)
per l'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*
produttori di Shiga-tossina (STEC)
in alimenti di origine vegetale - 2017**

A cura di:

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



1. INTRODUZIONE

Il ventesimo studio inter-laboratorio (PT20) organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) sulla ricerca e l'identificazione dei ceppi di *E. coli* produttori di Shiga tossina (STEC) è stato organizzato nel 2017 ai fini della valutazione esterna di qualità dei Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti ed è stato dedicato alla ricerca di STEC in campioni di vegetali (rucola).

La scelta di questa matrice si basa sulle seguenti osservazioni:

- negli ultimi anni i vegetali stanno acquisendo sempre più importanza epidemiologica quali veicolo di infezioni da patogeni zoonotici, inclusi i ceppi STEC;
- la rucola è stata recentemente coinvolta in un'epidemia di infezioni da STEC O157 in uno Stato Membro dell'Unione Europea.

Poiché il LNR per *E. coli* è anche Laboratorio di Riferimento Europeo (EURL) per questi microrganismi, lo studio nazionale è stato condotto contestualmente a quello dedicato ai LNR per *E. coli* degli Stati Membri della UE, che ha visto la partecipazione di 40 LNR operanti nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare. Il report dello studio europeo è disponibile sul sito web dell'EURL (http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT20.pdf). Questa relazione presenta i risultati dello studio nazionale, PT20, condotto a beneficio dei Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.

2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT20 consisteva nell'identificazione e isolamento di STEC in campioni di rucola contaminati con diverse concentrazioni di un ceppo STEC O111 mediante l'applicazione del metodo standard ISO TS 13136:2012. In particolare, i Laboratori che hanno accettato di partecipare al PT19 hanno ricevuto tre campioni di rucola, due dei quali contaminati con un ceppo STEC O111, uno ad alta carica ed uno a bassa carica.

Gli obiettivi dello studio erano:

- accrescere l'esperienza dei Laboratori nell'analisi per la ricerca di ceppi STEC in matrici alimentari mediante il metodo ISO TS 13136;



- accrescere l'esperienza dei Laboratori nell'identificazione di ceppi STEC appartenenti a sierogruppi diversi da O157;
- fornire un ulteriore supporto ai Laboratori Ufficiali per l'accreditamento della ISO/TS 13136:2012.

3. PARTICIPANTI

Ventidue Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT20. I Laboratori partecipanti, di seguito elencati, afferivano a 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS), il Laboratorio Prevenzione di 2 Agenzie di Tutela della Salute (ATS), rispettivamente della Brianza e di Milano, l'ARPA di Roma e la USL di Firenze.

- ARPA Lazio, Roma
- ATS della Brianza, Laboratorio di Prevenzione, Oggiono (LC)
- ATS della Città Metropolitana di Milano, Sezioni Biologia Molecolare e Microbiologia Clinica, Laboratorio di Prevenzione, Milano
- Azienda USL Toscana Centro, Laboratorio di Sanità Pubblica Area Vasta Toscana Centro, Firenze
- IZS Abruzzo e Molise "G.Caporale", Reparto di Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale, Laboratorio Nazionale di Riferimento per *L. monocytogenes*, 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, Centro di Rif. Reg. Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Lazio e Toscana "M. Aleandri", Pisa
- IZS del Mezzogiorno, UO Microbiologia degli Alimenti, Sezione di Salerno, Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, UOS Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM, Portici (NA)
- IZS della Sicilia, Laboratorio Alimenti ad uso zootecnico, Area Microbiologia degli alimenti, Palermo



- IZS della Sicilia "A. Mirri", Area Catania, Dip. Sanità Territoriale Interprovinciale CT-RG, Catania
- IZS della Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- IZS Umbria e Marche, UM Centro di Riferimento Patogeni Enterici CRRPE5, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Centro Regionale Autocontrollo, Pesaro
- IZS delle Venezie, Sezione di Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, *OIE/National Reference Laboratory for Salmonellosis*, Legnaro (PD)

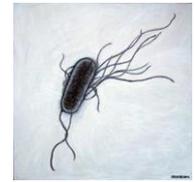
4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

La rucola utilizzata nel PT20 è stata acquistata al dettaglio il 7 Novembre 2017 e conteneva una flora di background pari a 7×10^4 UFC/g. La rucola è stata suddivisa in porzioni da 25 g in buste *stomacher* sterili, conservate a +4 °C fino alla preparazione dei campioni. Due porzioni così preparate, sono state immediatamente testate per la presenza di STEC mediante l'applicazione del metodo ISO TS 13136 e sono entrambe risultate negative per la presenza dei geni target del metodo nello screening in Real Time PCR.

I Laboratori partecipanti hanno ricevuto e analizzato tre campioni potenzialmente contaminati con STEC (1, 2 e 3) identificati con codici numerici assegnati in modo casuale e differenti per ogni laboratorio.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 10 Novembre 2017, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale (OD = 0,5 a 600 nm) del ceppo STEC O111 ED476. Le caratteristiche dei campioni sono riportate nella Tabella 1 e sono state considerate come "*gold standard*". Il valore dell'incertezza di misura associata all'inoculo utilizzato, calcolato secondo la norma ISO TS 19036:2006, era 0,138 log UFC/ml.



I campioni sono stati preparati con tre diversi livelli di contaminazione: zero, bassa carica e alta carica, e contenevano rispettivamente 0, 4 e 40 UFC del ceppo STEC per grammo di rucola. Il titolo dell'inoculo è stato verificato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey. Non appena preparati, i campioni sono stati mantenuti a +4 °C. I campioni, sono stati trasferiti in contenitori di sicurezza refrigerati e spediti tramite corriere il 13 Novembre 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.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di rucola oggetto dello studio

| Contaminante (Genotipo) | Livello di contaminazione: | | |
|--|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Campione 1 | Campione 2 | Campione 3 |
| STEC O111 (<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>eae+</i>) | - | Bassa carica: 4 UFC/ml | Alta carica: 40 UFC/ml |

In seguito all'assegnazione delle codifiche, i campioni sono stati trasferiti in contenitori di sicurezza refrigerati e spediti tramite corriere il 3 Aprile 2017.

4.2. Stabilità e omogeneità dei campioni

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state verificate in accordo alla norma ISO 17043:2010.

Per la verifica della stabilità, un gruppo di campioni di rucola sono stati contaminati il 1° Settembre 2017 in maniera analoga ai campioni oggetto del PT, come descritto nel paragrafo precedente. I campioni sono stati conservati a +4 °C e analizzati applicando il metodo ISO TS 13136:2012 dopo 3, 6, 10 e 13 giorni dalla preparazione. Lo screening in Real Time PCR ha mostrato positività a tutti i geni target per tutto l'intervallo di tempo



considerato, mentre non è stato possibile isolare il ceppo STEC O111 contaminante nei campioni saggiati dopo 10 giorni.

Per la verifica dell'omogeneità, otto repliche di ognuna delle tre aliquote test, allestite per la spedizione ai Laboratori, sono state selezionate casualmente subito dopo la preparazione e analizzate nei giorni 13 e 14 Novembre 2017, ottenendo i risultati attesi.

4.3. Metodi di laboratorio

I Laboratori partecipanti erano invitati ad applicare il metodo standard ISO TS 13136:2012.

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*. Il termine per inserire i risultati dello studio era il 22 Dicembre 2017. Dopo la scadenza per l'inserimento dei risultati del PT20, 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 Proficiency dei Laboratori

Di norma il LNR valuta la competenza dei Laboratori nell'identificazione dei geni target del ceppo STEC contaminante nella fase di screening in Real Time PCR e nell'isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC assegnando punti di penalità a risultati discordanti relativamente al "*gold standard*". Tale procedura non risulta applicabile al presente studio, in quanto i Laboratori partecipanti hanno riportato risultati concordi con quelli attesi per tutti i campioni.



5. RISULTATI

Per quanto riguarda la ricezione dei campioni, 14 Laboratori hanno ricevuto i campioni entro 24 ore dalla spedizione, 7 entro 48 ore e un solo Laboratorio dopo 4 giorni. Tutti i Laboratori hanno quindi potuto saggiare i campioni del PT20 entro il periodo di stabilità precedentemente valutato (sezione 4.2).

La temperatura alla quale i partecipanti hanno dichiarato di aver ricevuto i campioni variava tra 1°C e 6,8 °C per tutti i Laboratori, ad eccezione di un partecipante che ha misurato una temperatura dei campioni pari a 10 °C.

Tutti i 22 Laboratori che hanno ricevuto i campioni oggetto del PT20 hanno sottomesso i risultati dello studio. La Tabella 2 riporta i risultati della ricerca dei geni di virulenza nelle colture di arricchimento mediante Real Time PCR, mentre la Tabella 3 mostra i risultati della fase di isolamento.

Come è possibile osservare dai dati riportati nelle Tabelle 2 e 3, tutti i Laboratori hanno riportato risultati in accordo a quelli attesi sia nella fase di screening che nella fase di isolamento, ad eccezione di un Laboratorio (L377) che non ha effettuato il tentativo di isolamento dai campioni risultati positivi nella fase di screening in Real Time PCR.



Tabella 2. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti.

| NRL | Detection of virulence and serogroup-associated genes in: | | | | | | | | | | | |
|------------|---|-------------|------------|-----------------|-------------------------|-------------|------------|-----------------|--------------------------|-------------|------------|-----------------|
| | Sample 1 | | | | Sample 2 | | | | Sample 3 | | | |
| | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | <i>wbdlo111</i> | Low level contamination | | | | High level contamination | | | |
| | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | <i>wbdlo111</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | <i>wbdlo111</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | <i>wbdlo111</i> |
| True value | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| L118 | | | | | | | | | | | | |
| L189 | | | | | | | | | | | | |
| L202 | | | | | | | | | | | | |
| L203 | | | | | | | | | | | | |
| L283 | | | | | | | | | | | | |
| L287 | | | | | | | | | | | | |
| L300 | | | | | | | | | | | | |
| L317 | | | | | | | | | | | | |
| L339 | | | | | | | | | | | | |
| L377 | | | | | | | | | | | | |
| L425 | | | | | | | | | | | | |
| L516 | | | | | | | | | | | | |
| L657 | | | | | | | | | | | | |
| L664 | | | | | | | | | | | | |
| L667 | | | | | | | | | | | | |
| L739 | | | | | | | | | | | | |
| L773 | | | | | | | | | | | | |
| L795 | | | | | | | | | | | | |
| L806 | | | | | | | | | | | | |
| L807 | | | | | | | | | | | | |
| L927 | | | | | | | | | | | | |
| L975 | | | | | | | | | | | | |



Tabella 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC O111 nei campioni di acqua di germogliazione. Le caselle verdi indicano i risultati corretti, la casella arancione indica che il tentativo di isolamento non è stato effettuato.

| STEC strain isolation and genotyping from: | | | | | | | | | |
|--|----------|--------------------------------|-------------|-------------|------------|--------------------------------|-------------|-------------|------------|
| NRL | Sample 1 | Sample 2 | | | | Sample 3 | | | |
| | - | Isolamento del ceppo STEC O111 | Genotype | | | Isolamento del ceppo STEC O111 | Genotype | | |
| | | | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> |
| True value | None | + | + | + | + | + | + | + | + |
| L118 | | | | | | | | | |
| L189 | | | | | | | | | |
| L202 | | | | | | | | | |
| L203 | | | | | | | | | |
| L283 | | | | | | | | | |
| L287 | | | | | | | | | |
| L300 | | | | | | | | | |
| L317 | | | | | | | | | |
| L339 | | | | | | | | | |
| L377 | | ND | | | | ND | | | |
| L425 | | | | | | | | | |
| L516 | | | | | | | | | |
| L657 | | | | | | | | | |
| L664 | | | | | | | | | |
| L667 | | | | | | | | | |
| L739 | | | | | | | | | |
| L773 | | | | | | | | | |
| L795 | | | | | | | | | |
| L806 | | | | | | | | | |
| L807 | | | | | | | | | |
| L927 | | | | | | | | | |
| L975 | | | | | | | | | |



6. CONCLUSIONI

Il PT20 si proponeva di accrescere l'esperienza dei Laboratori Ufficiali nell'analisi di matrici contaminate con un ceppo STEC appartenente a un sierogruppo differente dall'O157.

Per questo studio è stata scelta una matrice vegetale, la rucola, con rilevanza epidemiologica quale veicolo di infezioni da ceppi STEC.

Il PT20 ha visto l'adesione di un elevato numero di Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, i quali hanno correttamente identificato e caratterizzato il ceppo STEC contaminante. I risultati di questo studio evidenziano che in Italia esiste una rete di Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, rappresentata da un cospicuo numero di Laboratori distribuiti sulla maggior parte del territorio nazionale, con elevata competenza nell'identificazione e isolamento dei ceppi STEC negli alimenti.