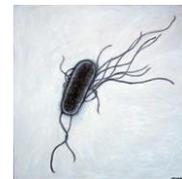




**Risultati del 21° test inter-laboratorio nazionale (PT21)
sull'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*
produttori di Shiga-tossina (STEC)
in campioni di germogli - 2018**

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 ventunesimo studio inter-laboratorio (PT21) 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 2018 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 germogli. Tale scelta è basata sul fatto che il Regolamento (EU) 209/2013, in vigore dal 1° Luglio 2013, sui criteri microbiologici applicabili ai germogli destinati al consumo umano diretto 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 dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* (EURL-VTEC) per rilevare la presenza di STEC O104:H4. Pertanto, i Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti devono avere accreditato il metodo ISO TS 13136:2012 e devono essere preparati ad analizzare i germogli per la presenza di STEC.

Poiché il LNR per *E. coli* è anche 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 39 LNR operanti nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare. Il report dello studio europeo è disponibile al sito web dell'EURL-VTEC (http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT21.pdf). Questa relazione presenta i risultati dello studio nazionale PT21, condotto a beneficio dei Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.

2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT21 consisteva nell'identificazione e isolamento di STEC in campioni di germogli contaminati con diverse concentrazioni di un ceppo STEC O26 mediante l'applicazione del metodo standard ISO TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'EURL-VTEC per rilevare la presenza di STEC O104:H4. In particolare, i Laboratori partecipanti hanno ricevuto e saggiato tre campioni di germogli, due dei quali contaminati con un ceppo STEC O26, uno ad alta carica e 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;
- 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 del metodo ISO TS 13136:2012.

3. PARTECIPANTI

Ventidue Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT21. I partecipanti, di seguito elencati, includevano Laboratori afferenti a 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS), i Laboratori di Prevenzione di due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), rispettivamente della Brianza e di Milano, l'ARPA di Roma e quella della Valle d'Aosta, e la USL di Firenze.

- ARPA Valle d'Aosta, Laboratorio di Microbiologia, Saint-Christophe (AO)
- 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 Puglia e Basilicata, Sezione di Putignano (BA)
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna

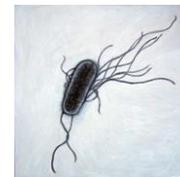


- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Rif. Reg. Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Lazio e Toscana, Sezione di Pisa
- IZS del Mezzogiorno, UO Microbiologia degli Alimenti, Sezione di Salerno, Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, UOS Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM, 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, 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 matrice utilizzata nello studio consisteva in germogli di ravanella rosso *purple*, confezionati per la vendita al dettaglio. La flora di background è stata stimata essere pari a circa 6×10^7 UFC/g. I germogli sono stati suddivisi in porzioni da 25 g in buste *stomacher* sterili, conservate a +4 °C fino alla preparazione dei campioni. Due aliquote così preparate, sono state immediatamente testate per la presenza di STEC mediante l'applicazione del metodo ISO TS 13136:2012 e sono entrambe risultate negative per la presenza dei geni target del metodo nello screening in Real Time PCR.



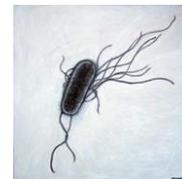
I Laboratori partecipanti hanno ricevuto e analizzato tre campioni potenzialmente contaminati con STEC (1, 2 e 3) identificati con codici numerici assegnati in modo casuale e differenti per ogni laboratorio.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 13 Aprile 2018, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale ($OD = 0,5$ a 600 nm) del ceppo STEC O26 C1188-02 positivo per i geni *eae*, *stx1* ed *stx2*. 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 $0,209\text{ log UFC/ml}$.

I tre campioni corrispondevano a tre diversi livelli di contaminazione: zero, bassa carica e alta carica e contenevano rispettivamente 0, 2 e 20 UFC del ceppo STEC per grammo di germogli. Il titolo dell’inoculo del ceppo C1188-02 utilizzato per la contaminazione dei campioni è stato verificato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey. Non appena preparati, i campioni sono stati mantenuti a $+4\text{ °C}$. In seguito all’assegnazione delle codifiche, i campioni, sono stati trasferiti in contenitori di sicurezza refrigerati e spediti tramite corriere il 16 Aprile 2018. Ai Laboratori è stata data l’indicazione di iniziare le analisi appena possibile, registrando la temperatura e le condizioni dei campioni all’arrivo e la data di inizio analisi.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di rucola oggetto dello studio

Contaminante (<i>Genotipo</i>)	Livello di contaminazione:		
	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Ceppo C1188-02, STEC O26 (<i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> , <i>eae+</i>)	-	Bassa carica: 2 UFC/g	Alta carica: 20 UFC/g



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 di germogli è stato contaminato il 26 Gennaio 2018 in maniera analoga ai campioni oggetto del PT, preparati come descritto nel paragrafo precedente. I campioni sono stati conservati a +4 °C e analizzati applicando il metodo ISO TS 13136:2012 dopo 3, 5 e 10 giorni dalla preparazione. Lo screening in Real Time PCR ha mostrato positività ai geni target per tutto l'intervallo di tempo considerato. Il ceppo STEC O26 contaminante è stato isolato nei campioni corrispondenti all'alto livello di contaminazione ad ogni tempo considerato, mentre non è stato possibile isolarlo nei campioni a bassa contaminazione, neppure dopo solo tre giorni dalla preparazione.

Per la verifica dell'omogeneità, dieci repliche dei campioni contaminati (10 alto livello e 10 basso livello) e due campioni negativi sono stati selezionati casualmente subito dopo la preparazione e analizzati nei giorni 16 e 17 Aprile 2018, ottenendo i risultati attesi per i campioni ad alto livello di contaminazione. I risultati dello screening in Real Time PCR hanno evidenziato dei cicli soglia molto elevati per i geni target nei campioni a basso livello di contaminazione, inoltre in un campione non è stato possibile identificare la presenza del gene *stx1* e in un altro non sono stati identificati i geni *stx1* e *wzx*_{O26}.

4.3. Metodi di laboratorio

I Laboratori partecipanti erano invitati ad applicare il metodo standard ISO TS 13136:2012 tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'EURL-VTEC per rilevare la presenza di STEC O104:H4 usando l'acqua peptonata come terreno di arricchimento.

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, 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 stato fissato



al 14 Maggio 2018. Dopo la scadenza per l'inserimento dei risultati del PT21, 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: Valutazione della *Proficiency* dei Laboratori

Di norma il LNR *E. coli* 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*". In particolare, quattro punti di penalità vengono assegnati ad ogni risultato incorretto o mancante nell'identificazione dei geni di virulenza *stx1* e *stx2*. Due punti di penalità vengono, invece, assegnati ad ogni risultato non corretto o mancante nell'identificazione del gene *eae* e dei geni associati al sierogruppo.

In base ai dati ottenuti presso il Laboratorio Nazionale ed Europeo di Riferimento per *E. coli* nel corso delle analisi volte a valutare la stabilità dei campioni e ai risultati ottenuti nel corso dello studio dedicato ai LNR per *E. coli* degli Stati Membri della UE, è emerso che la concentrazione di STEC O26 utilizzata per il basso livello di contaminazione era prossima al limite di rilevabilità stimato per la fase di isolamento del metodo (http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT21.pdf). Si è pertanto stabilito di assegnare due punti di penalità solo nel caso di mancato isolamento dal campione 3 (alto livello di contaminazione).

La somma dei punti di penalità dà luogo ad un punteggio considerato per la valutazione della *proficiency* dei laboratori, considerando come non adeguata quella dei Laboratori che ottengono un punteggio pari o superiore ad 8.

5. RISULTATI

Per quanto riguarda la ricezione dei campioni, solo quattro laboratori hanno ricevuto i campioni entro 48 ore ed uno dopo 72 ore, tutti gli altri hanno dichiarato di averli ricevuti entro 24 ore dalla spedizione. Tutti i Laboratori hanno quindi potuto saggiare i campioni del PT21 entro il periodo di stabilità precedentemente valutato (sezione 4.2).



La temperatura riportata dai partecipanti variava tra +0,3 °C e +5,4 °C, con l'unica eccezione del Laboratorio L311 che ha registrato una temperatura dei campioni pari a +11 °C, Tutti i 22 Laboratori che hanno ricevuto i campioni oggetto del PT21 hanno sottomesso al LNR *E. coli* 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.

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

Come è possibile osservare dai dati riportati nella Tabella 2, tutti i Laboratori hanno riportato risultati nella fase di screening in accordo a quelli attesi.

5.2. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC contaminante

I risultati relativi all'isolamento del ceppo STEC contaminante sono riportati nella Tabella 3. Il campione 1 era stato correttamente identificato come negativo nella fase di screening. Per quanto riguarda l'isolamento nei campioni contaminati artificialmente, 12 di 22 Laboratori hanno isolato il ceppo STEC O26 sia dal campione 2 (basso livello di contaminazione) che dal campione 3 (alto livello di contaminazione). Quattro Laboratori non sono stati in grado di isolare il ceppo STEC contaminante da nessuno dei due campioni. Tre Laboratori hanno isolato il ceppo STEC O26 solo nel campione ad alta carica, e i rimanenti tre hanno avuto successo nell'isolamento solo nel campione 2, a bassa carica. Infine, il ceppo STEC O26 è stato caratterizzato correttamente da tutti i Laboratori che sono riusciti ad isolarlo.

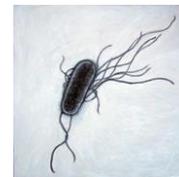


Tabella 2. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti.

Lab.	Identificazione della presenza dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici in:											
	Campione 1 (negativo)				Campione 2 (basso livello di contaminazione)				Sample 3 (alto livello di contaminazione)			
	stx1	stx2	eae	WZX _{O26}	stx1	stx2	eae	WZX _{O26}	stx1	stx2	eae	WZX _{O26}
<i>Gold standard</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L144												
L283												
L288												
L311												
L339												
L439												
L441												
L504												
L516												
L590												
L683												
L698												
L765												
L783												
L793												
L821												
L825												
L875												
L885												
L929												
L979												
L980												

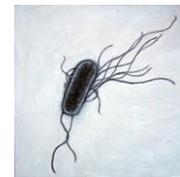
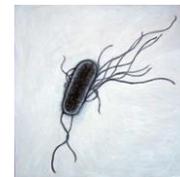


Tabella 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC O126 nei campioni di germogli. Le caselle verdi indicano i risultati corretti, le caselle rosse indicano che il tentativo di isolamento non ha avuto successo.

Isolamento e caratterizzazione del ceppo contaminante in:									
NRL	Campione 1	Campione 2				Campione 3			
	-	Isolamento STEC O26	Genotipo			Isolamento STEC O26	Genotipo		
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
<i>Gold standard</i>	None	+	+	+	+	+	+	+	+
L144									
L283									
L288									
L311									
L339									
L439									
L441									
L504									
L516									
L590									
L683									
L698									
L765									
L783									
L793									
L821									
L825									
L875									
L885									
L929									
L979									
L980									



5.3 Valutazione della *Proficiency* dei Laboratori

Nella fase di screening nessun Laboratorio ha ottenuto punti di penalità.

Per quanto concerne la fase di isolamento, come descritto nel paragrafo 4.5, sono stati attribuiti punti di penalità solo nel caso di mancato isolamento dal campione corrispondente all'alto livello di contaminazione. Sette dei 22 Laboratori partecipanti hanno ottenuto 2 punti di penalità totali per il PT 21, valore molto inferiore alla soglia stabilita al punteggio pari a 8 che identifica una *proficiency* non soddisfacente (figura 1).

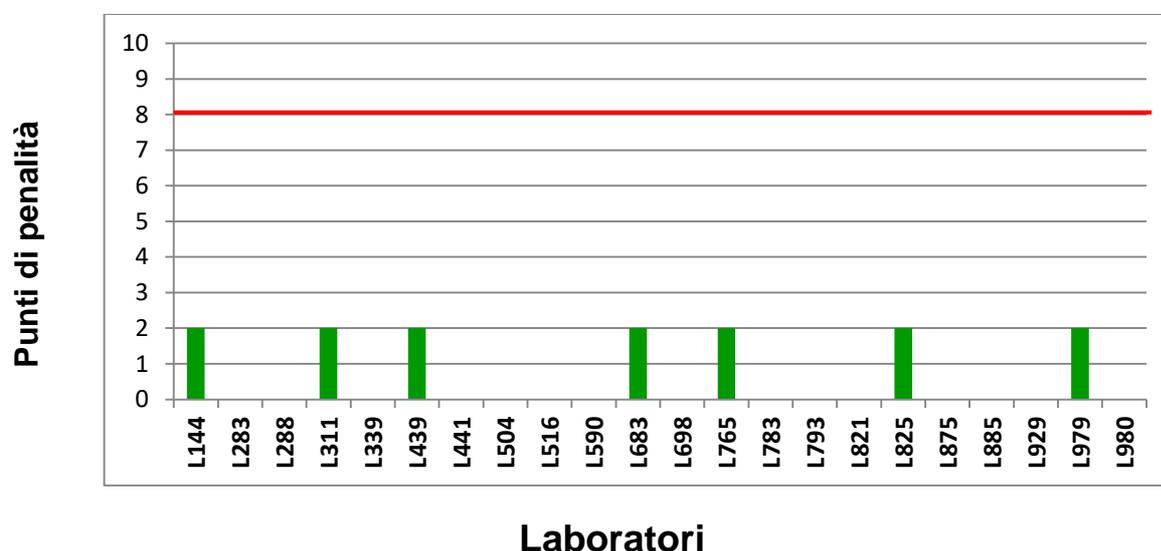


Figura 1. Valutazione della *Proficiency* dei Laboratori. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti nel paragrafo 4.5. Le barre verdi indicano punteggi di penalità corrispondenti ad una *proficiency* soddisfacente. Il valore soglia per la valutazione di una *proficiency* non soddisfacente è mostrato nella figura come una linea rossa.

6. CONCLUSIONI

Il PT21 è stato condotto su germogli in quanto il Regolamento Europeo 209/2013 ha introdotto per questa matrice un criterio microbiologico che prevede l'assenza di STEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4. Il presente studio si proponeva di accrescere



l'esperienza dei Laboratori Ufficiali nell'analisi di tale matrice contaminata con un ceppo STEC appartenente a un sierogruppo differente dall'O157.

I campioni sono stati contaminati con un ceppo STEC O26, utilizzando diversi livelli di contaminazione. In particolare, il livello di bassa carica era prossimo al limite di rilevabilità stimato per la fase di isolamento del metodo (http://old.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT21.pdf).

Il PT21 ha visto l'adesione di un elevato numero di Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, i quali hanno correttamente identificato la presenza di STEC nella fase di screening. La fase di isolamento ha messo nuovamente in evidenza la possibile difficoltà dell'analisi di tale matrice, principalmente dovuta alla presenza di una elevata flora di background. Tuttavia tutti i Laboratori partecipanti hanno mostrato una *proficiency* più che soddisfacente.

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.