



**Risultati del 25° test inter-laboratorio nazionale (PT25)
sull'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*
produttori di Shiga-tossina (STEC)
in campioni di farina - 2019**

A cura di:

*Silvia Arancia, Arianna Boni, Gianfranco Brambilla, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Fabio Galati,
Federica Gigliucci, Arnold Knijn, Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli,
Margherita Montalbano Di Filippo, Stefano Morabito, Rosangela Tozzoli*



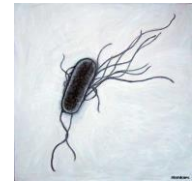
1. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Recentemente, la farina è stata identificata come un veicolo per le infezioni da *Escherichia coli* produttore di Shiga tossine (STEC) e sono stati riportati diversi episodi epidemici collegati al consumo di farina contaminata da STEC, l'ultimo dei quali verificatosi tra Canada e Stati Uniti nel 2019. Pertanto, LNR per *E. coli* ha deciso di organizzare questo studio inter-laboratorio, Proficiency Test 25 (PT25), utilizzando questa particolare matrice, con lo scopo di migliorare la preparazione dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale per l'identificazione della presenza di STEC nella farina, applicando la ISO TS 13136:2012. Il presente documento rappresenta la valutazione complessiva del PT25.

2. PARTECIPANTI

Venticinque Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT25. I partecipanti, di seguito elencati, includevano laboratori afferenti a 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZZSS), l'ARPA di Roma e quella del Friuli-Venezia Giulia, i Laboratori di Prevenzione di due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), rispettivamente della Brianza e di Milano, e la USL di Firenze. Nel dettaglio, i laboratori partecipanti erano:

- ARPA FVG - SOC Laboratorio, SOS Laboratorio Alimenti e Microbiologia, Udine
- ARPA Lazio, Unità Laboratorio Sanitario, Servizio Ambiente e Salute, Dipartimento Prevenzione e Laboratorio integrato, 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, 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 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 Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Genova
- IZS Umbria e Marche, 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)
- IZS delle Venezie, Sezione di Trento

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

La farina utilizzata nello studio è stata acquistata presso un rivenditore al dettaglio. La presenza di eventuale microflora di background naturale è stata valutata seminando su TSA e MacConkey agar diluizioni seriali di farina omogeneizzata in Acqua Peptonata



Tamponata. In seguito all'applicazione di questa procedura, nessuna crescita è stata osservata.

Due aliquote da 25 g della farina utilizzata per la preparazione dei campioni test, sono state analizzate per la presenza di STEC secondo il metodo ISO TS 13136:2012 e sono risultate negative allo screening con PCR per la ricerca dei geni target associati agli STEC.

La farina acquistata è stata pertanto tutta suddivisa in aliquote e contaminata con diverse concentrazioni di analita (un ceppo STEC di sierogruppo O121) per le prove di stabilità. Queste sono state condotte nel mese di Settembre 2019 e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati ottenuti nei saggi di stabilità

STEC O121 concentrazione	T0 Replicata 1		T0 Replicata 2		T1 (4 giorni) Replicata 1		T1 (4 giorni) Replicata 2	
	Real Time PCR	Isolamento	Real Time PCR	Isolamento	Real Time PCR	Isolamento	Real Time PCR	Isolamento
1 UFC/25 g	+	+	+	+	+	+	+	+
5 UFC/25 g	+	+	+	+	+	+	+	+
10 UFC/25g	+	+	+	+	+	+	+	+

STEC O121 concentrazione	T2 (7 giorni) Replicata 1		T2 (7 giorni) Replicata 2		T3 (11 giorni) Replicata 1		T2 (11 giorni) Replicata 2	
	Real Time PCR	Isolamento	Real Time PCR	Isolamento	Real Time PCR	Isolamento	Real Time PCR	Isolamento
1 UFC/25 g	-	ND	-	ND	+	+	-	ND
5 UFC/25 g	+	+	+	+	+	+	+	+
10 UFC/25g	+	+	+	+	+	+	+	+

Dai risultati ottenuti nei test di stabilità, sono stati selezionati i livelli di contaminazione per i campioni da inviare per il PT25. Le caratteristiche dei campioni sono riportate nella

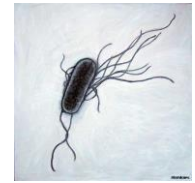


Tabella 2 e sono state considerate come valori di riferimento per la valutazione dei risultati riportati dai laboratori partecipanti.

Tabella 2: Caratteristiche dei campioni di farina inclusi nello studio

Analita (<i>Genotipo</i>)	Livello di contaminazione in:		
	Campione 1	Campione 2	Campione 3
ED898 STEC O121 (<i>stx2+</i> , <i>eae+</i>)	0 UFC	1 UFC/25 g	5 UFC/25 g

Tre campioni, ciascuno composto da 25 g di farina contaminata come descritto (Tabella 2), confezionati in buste sterili per omogeneizzatore peristaltico, sono stati inviati ai laboratori come campioni in cieco, ciascuno associato a un diverso codice assegnato in modo casuale ad ogni laboratorio.

La contaminazione artificiale dei campioni inviati ai laboratori partecipanti, è stata effettuata in data 11 Ottobre 2019, utilizzando diluizioni di una coltura esponenziale in terreno liquido (0,5 OD letta a 600 nm) di un ceppo STEC O121 denominato ED898. Un'incertezza di misura di 0,4 log UFC/ml è stata associata all'inoculo standardizzato, utilizzando la procedura descritta nella ISO/TS 19036:2006.

Quando i campioni test sono stati preparati, due campioni negativi sono stati saggiati e hanno dato i risultati attesi. Otto campioni per ognuno dei due livelli di contaminazione sono stati scelti per i saggi di omogeneità e anch'essi analizzati. Tutti i campioni contaminati con 5 UFC/25 g e due degli otto campioni contaminati con 1 UFC/25 g, hanno dato i risultati attesi.

I campioni sono stati confezionati per il trasporto a temperatura ambiente e affidati al corriere in data 14 Ottobre 2019. I laboratori partecipanti sono stati invitati a iniziare le



analisi dei campioni stessi subito dopo il loro arrivo, riportando data di consegna e temperatura rilevata all'interno della confezione, nell'apposito modulo online che precede la schermata per la sottomissione dei risultati.

3.2 Sottomissione dei risultati mediante servizio *online*

I risultati sono stati sottomessi direttamente attraverso una piattaforma *online*, usando la pagina dedicata nell'Area Riservata del sito web dell'EURL-VTEC.

I Laboratori, già in possesso delle credenziali per accedere all'Area Riservata, hanno ricevuto le istruzioni per il PT25. La pagina dedicata alla sottomissione dei risultati del test inter-laboratorio presenta sia la lista dei campioni che il modulo nel quale riportare le informazioni riguardanti la relativa data di arrivo, temperatura e integrità del conferimento. Come sempre, un ulteriore campo libero è disponibile per aggiungere annotazioni e segnalare qualsiasi problema inerente la consegna e/o l'imballaggio del campione.

Circa una settimana dopo il termine ultimo per la sottomissione dei risultati, la piattaforma stessa genera in automatico un report individuale che ciascun partecipante può stampare e che contiene i risultati sottomessi e quelli attesi, direttamente dal sito e tramite l'uso delle proprie credenziali d'accesso.

3.2.1 Assegnazione di punti di penalità ai Laboratori relativamente allo screening dei campioni con Real Time PCR

La competenza di ogni Laboratorio nell'identificazione dei geni STEC target nelle colture di arricchimento è stata valutata assegnando quattro punti di penalità ad ogni risultato sbagliato o mancante, riguardante l'identificazione dei geni di virulenza, *stx1* e *stx2*. Due punti di penalità sono stati assegnati ai laboratori che non hanno identificato la presenza del gene *eae*. Sulla base dei risultati ottenuti nei test di omogeneità, non sono state assegnate penalità ai risultati negativi in PCR per *stx2* nei campioni con il livello più basso di contaminazione.



3.2.2. Assegnazione di punti di penalità ai Laboratori nell'isolamento dei ceppi STEC dalle colture arricchite, positive in PCR

La competenza di ogni Laboratorio nell'isolamento dei ceppi STEC dagli arricchimenti colturali dei campioni positivi, è stata valutata assegnando due punti di penalità solo per il mancato isolamento dal campione 3. Nessun punto di penalità è stato invece assegnato per il campione con il livello più basso di contaminazione, poiché quest'ultimo era al limite della rilevabilità della procedura.

Per quanto riguarda la caratterizzazione dei ceppi isolati, l'assegnazione dei punti di penalità è stata effettuata come per lo screening in Real Time PCR, con l'ulteriore attribuzione di due punti di penalità ai Laboratori che non hanno identificato il sierogruppo O121 nel ceppo STEC isolato.

3.2.3. Valutazione della competenza dei laboratori nella procedura generale

La somma dei punti di penalità ottenuti nei differenti passaggi della procedura analitica (come in 3.2.1 e 3.2.2), ha determinato un punteggio totale, utilizzato per una valutazione complessiva della prestazione dei partecipanti. La competenza dei laboratori che hanno ottenuto un punteggio più alto di otto, è stata considerata non soddisfacente.

3.2.4. Caratteristiche prestazionali del metodo

La sensibilità (Se) e la specificità (Sp) sono state calcolate rispettivamente per i passaggi di screening e isolamento.

Sensibilità: $Se = [\text{veri positivi} / (\text{veri positivi} + \text{falsi negativi})] \times 100$

Specificità: $Sp = [\text{veri negativi} / (\text{veri negativi} + \text{falsi positivi})] \times 100$

Il limite di rilevazione (LOD) è stato calcolato per il passaggio di isolamento utilizzando la procedura descritta da Wilrich and Wilrich (Journal of AOAC international, Vol. 92 No 6, 2009, 1763-1772).



4. RISULTATI

Venti dei 25 partecipanti hanno ricevuto i campioni entro 24 ore e 5 entro 48 ore dalla spedizione. Tutti i Laboratori hanno quindi potuto saggiare i campioni del PT25 entro il periodo di stabilità precedentemente valutato (sezione 3.1).

La temperatura riportata dai partecipanti variava tra i 4 e i 25 °C, ma per questo tipo di matrice non era previsto il trasporto refrigerato.

Tutti i 25 Laboratori che hanno ricevuto i campioni oggetto del PT hanno sottomesso al LNR *E. coli* i risultati dello studio. La Tabella 3 riporta i risultati della ricerca dei geni di virulenza nelle colture di arricchimento mediante Real Time PCR, mentre la Tabella 4 mostra i risultati della fase di isolamento.

La Figura 1 rappresenta graficamente la percentuale dei laboratori che hanno identificato correttamente la presenza di STEC alla fase di screening, rispettivamente nel campione 2 e nel campione 3.

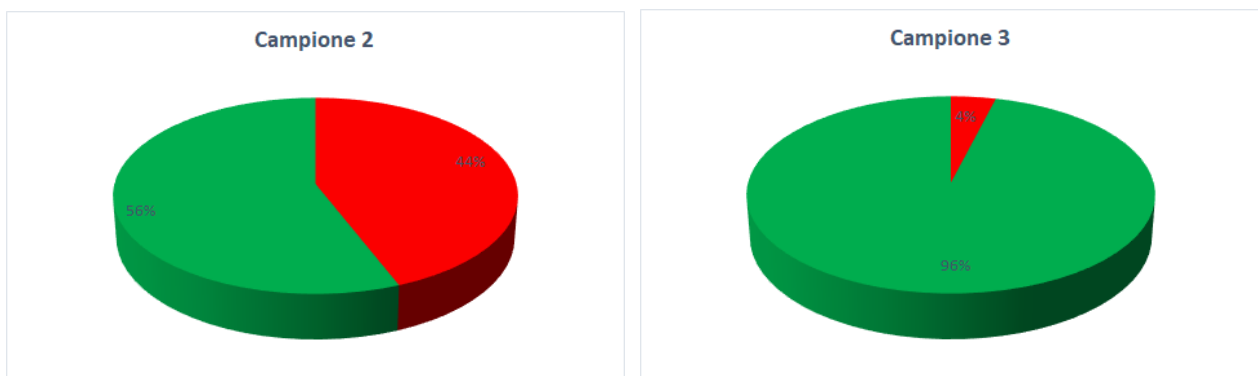


Figura 1. Screening dei campioni con Real Time PCR: percentuale di Laboratori che hanno correttamente identificato la presenza di STEC nei campioni inoculati (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato).



Tabella 3. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, quelle rosse i risultati non corretti. Le caselle in bianco corrispondono a campi per i quali non sono stati riportati valori.

Identificazione della presenza dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici in:												
Lab.	Campione 1 (negativo)				Campione 2 (livello di contaminazione più basso)				Campione 3 (livello di contaminazione più alto)			
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>Geni top-5</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>Geni top-5</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>Geni top-5</i>
Gold standard	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
L105						-						
L125					+				+			
L137												
L156						-						
L183												
L230	+	+	+		+				+			
L235						-						
L293												
L360										-		
L387												
L460												
L477						-						
L498												
L525												
L593												
L610												
L626						-						
L694						-						
L699						-						
L763						-						
L834						-						
L835		+	+			-						
L853												
L931												
L977		+	+			-						

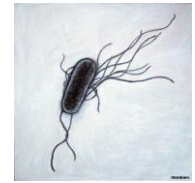


Tabella 4. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC O121 nei campioni di farina. Le caselle verdi indicano i risultati corretti, le caselle rosse indicano che il tentativo di isolamento non ha avuto successo. Le caselle in bianco corrispondono ai valori per cui non è stato riportato alcun risultato. Il grigio indica che non ha potuto effettuare l'isolamento in quanto il campione è risultato negativo per STEC in fase di screening.

Isolamento e caratterizzazione del ceppo contaminante in:									
Lab.	Campione 1	Campione 2				Campione 3			
		Isolamento STEC O121	Genotipo			Isolamento STEC O121	Genotipo		
	-		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
Gold standard	None	+	-	+	+	+	-	+	+
L105									
L125			+				+		
L137		ONT				ONT			
L156									
L183									
L230			+				+		
L235						ONT			
L293		ONT				ONT			
L360		ONT							
L387									
L460									
L477									
L498									
L525									
L593		ONT				ONT			
L610									
L626									
L694						ONT			
L699									
L763									
L834									
L835						ONT			
L853									
L931									
L977									



Il calcolo dei valori di **Se** e **Sp** nella fase di screening del metodo ha dato i seguenti risultati:

	Se³	Sp⁴
stx1	ND ¹	93,7 %
stx2	96,2 %	89 %
eae	100 %	ND ²

¹ La Se per *stx1* non è calcolabile perché nessuno dei campioni era *stx1* positivo.

² La Sp per *eae* è riportata come non determinata in quanto i campioni sono stati correttamente identificati come *eae* negativi.

³ La Se è stata calcolata solo sui risultati del campione ad alta carica. Per quanto riguarda il campione a bassa carica, essendo quest'ultima inferiore al valore di LOD₅₀, non è stato possibile valutare come errore i risultati riportati come negativi.

⁴ La Sp per *stx1* è stata calcolata sul totale delle 75 determinazioni effettuate.

Per quanto riguarda l'**isolamento**, l'analisi dei risultati ha mostrato una **Se** del **100 %** per il campione a bassa carica e dell'**88,8 %** per il campione ad alta carica. In entrambi i casi, la Se per l'isolamento è stata calcolata sulla base dei soli laboratori che avevano identificato positività durante la fase di screening.

4.1. Valutazione della competenza dei Laboratori

La Figura 2 mostra il punteggio ottenuto da ogni laboratorio. Dei 25 partecipanti, due, avendo superato il punteggio di 8, non hanno ottenuto una valutazione soddisfacente.

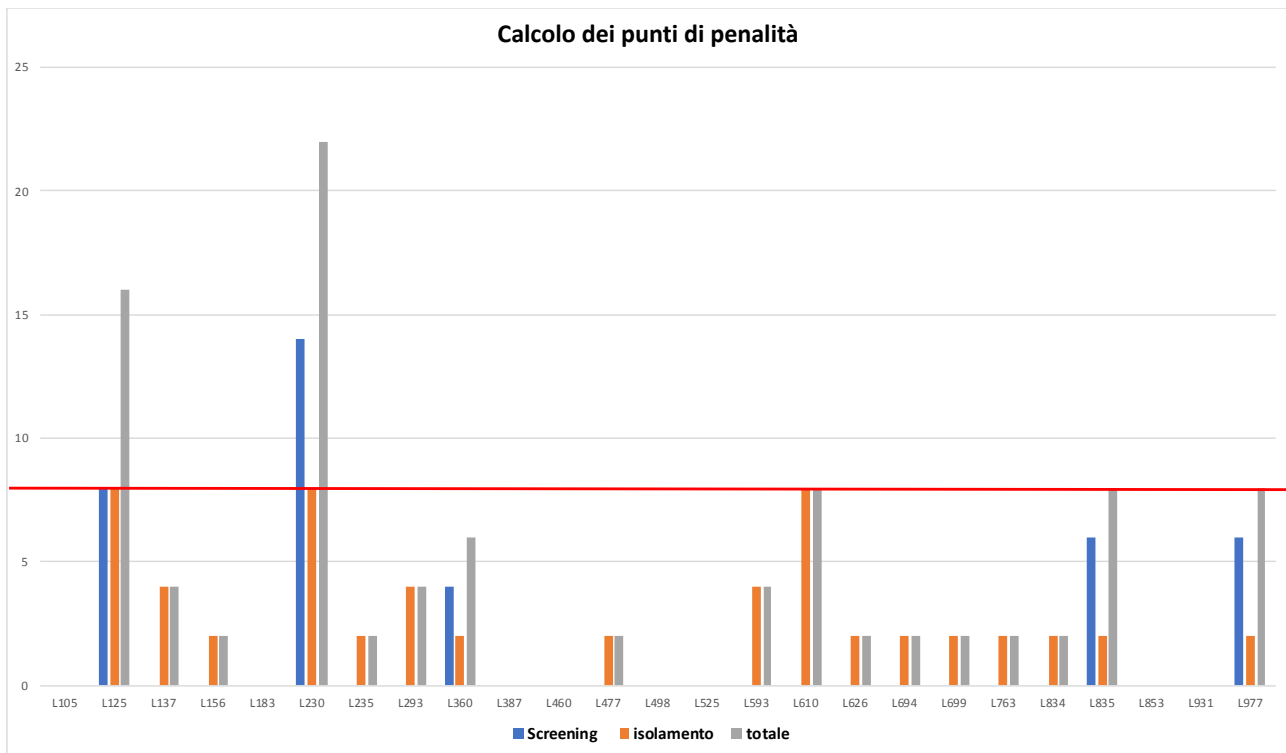


Figura 2. Valutazione della competenza dei Laboratori. La riga rossa raffigura la soglia degli 8 punti di penalità ai fini della valutazione della prestazione del laboratorio (vedi paragrafo 3.3.3).

6. CONCLUSIONI

Il PT25 aveva come obiettivo di valutare la capacità dei laboratori del controllo ufficiale degli alimenti di identificare la presenza di un ceppo STEC appartenente al sierogruppo O121 nella farina, una matrice recentemente identificata come veicolo di infezione da STEC. Il set analitico era costituito da tre campioni di 25 grammi di farina ciascuno, con diversi livelli di contaminazione dal ceppo STEC. In particolare, un campione era negativo, uno contaminato con una quantità di batterio leggermente al di sotto della LOD_{50} , determinata dal Laboratorio di Riferimento Europeo per l'*E. coli* nel corso dell'analogo PT organizzato a livello europeo, e uno con una quantità cinque volte superiore. I risultati hanno mostrato una buona preparazione del network dei laboratori ufficiali italiani. Infatti, il campione negativo è stato riconosciuto come tale da circa il 90 % dei partecipanti. Tre



laboratori hanno identificato il ceppo STEC nel campione negativo, presumibilmente per una contaminazione accidentale. Per quanto riguarda invece i campioni positivi, quello a bassa carica è stato trovato positivo dal 44 % dei laboratori. Questo dato, apparentemente negativo, è in realtà in linea con il risultato atteso dal momento che la quantità di ceppo contaminante era prossima, anzi leggermente al di sotto, della LOD₅₀. Tale valore infatti rappresenta il livello di contaminazione a cui approssimativamente corrisponde un valore positivo per il 50 % dei laboratori. Il campione con la carica più alta è stato trovato positivo dal 96 % dei laboratori. Infine, per quanto riguarda l'isolamento, tutti i laboratori che avevano identificato il campione a bassa carica come positivo, sono anche riusciti ad isolare il ceppo contaminante. Analogamente, tutti i laboratori hanno isolato il ceppo STEC dal campione con alta carica, ad eccezione di tre che non hanno riportato questa informazione.

Per quanto riguarda la valutazione globale, due dei 25 laboratori partecipanti hanno ottenuto un punteggio superiore alla soglia degli otto punti di penalità e sono pertanto giudicati insoddisfacenti.

I risultati di questo studio evidenziano che la rete italiana dei laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti presenta una elevata competenza nell'identificazione e isolamento dei ceppi STEC negli alimenti.