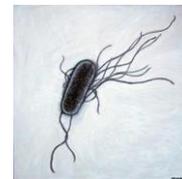




**Risultati del 27° test inter-laboratorio (PT27)  
sull'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*  
produttori di Shiga-tossina (STEC)  
in campioni di basilico - 2020**

**A cura di:**

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



## 1. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT27 consisteva nell'identificazione e isolamento di STEC in campioni di basilico contaminati con diverse concentrazioni di un ceppo STEC di sierogruppo O88 mediante l'applicazione del metodo standard ISO TS 13136:2012. In particolare, i Laboratori partecipanti hanno ricevuto e analizzato tre campioni, due dei quali contaminati con un ceppo STEC O88, uno ad alta carica e uno a bassa carica.

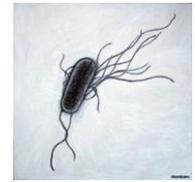
Gli obiettivi dello studio erano:

- 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 supporto ai Laboratori Ufficiali per l'accreditamento del metodo ISO TS 13136:2012.

## 2. PARTECIPANTI

Ventiquattro Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT27. I partecipanti, di seguito elencati nel dettaglio, includevano Laboratori afferenti a 20 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS), l'Agenzia provinciale per l'ambiente della Provincia autonoma di Bolzano, i Laboratori di Prevenzione di due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), rispettivamente della Brianza e di Milano, e la USL di Firenze.

1. Laboratorio di prevenzione, ATS Brianza, Oggiono (Lecco)
2. UOC Laboratorio di Prevenzione ATS della Città Metropolitana di Milano, UOS Microbiologia e Biologia Molecolare, Milano
3. Provincia Autonoma di Bolzano – Alto Adige, Agenzia provinciale per l'ambiente, Laboratorio biologico, Laives
4. Azienda USL Toscana Centro, Laboratorio di Sanità Pubblica Area Vasta Toscana Centro, Firenze
5. IZS Abruzzo e Molise G. Caporale, *Food Hygiene Unit*, Teramo
6. IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
7. IZS Puglia e Basilicata, Putignano (BA)
8. IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Controllo alimenti, Brescia



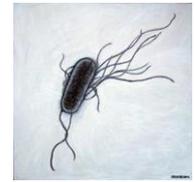
9. IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna
10. IZS Lazio e Toscana, DO Microbiologia degli Alimenti, Laboratorio Biotecnologia applicata agli Alimenti (LTV), Roma
11. IZS Lazio e Toscana, Sicurezza Alimentare - UOT Toscana Nord - Sede di Pisa
12. IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, S.C. Sicurezza e Qualità degli Alimenti, Torino
13. IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, S.S. Microbiologia Molecolare ed Analisi Genomiche, Torino
14. IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, S.S. Sezione di Genova-Portualità, Genova
15. IZS Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Sezione di Novara
16. IZS della Sicilia, Laboratorio Alimenti ad uso zootecnico, Area Microbiologia degli alimenti, Palermo
17. IZS della Sicilia, Area Catania
18. IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
19. IZS Umbria e Marche, Centro di Riferimento Patogeni Enterici CRRPE5, Perugia
20. IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo
21. IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Pesaro
22. IZS delle Venezie, SCT4 – Sezione di Pordenone, Cordenons
23. IZS delle Venezie, Legnaro (PD)
24. IZS delle Venezie, Sezione di Trento

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. Preparazione dei campioni**

Il basilico utilizzato nello studio è stato acquistato 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 basilico omogeneizzato in Acqua Peptonata Tamponata. In seguito all'applicazione di questa procedura, nessuna crescita è stata osservata su entrambi i terreni utilizzati.

Due aliquote da 25 g del basilico utilizzato per la preparazione dei campioni inviati ai laboratori partecipanti, 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 (*stx*).



Il Basilico è stato tutto suddiviso in aliquote da 25 g e contaminato con diverse concentrazioni di un ceppo STEC di sierogruppo O88 per le prove di stabilità. Queste sono state condotte nel mese di Settembre 2020 e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Risultati ottenuti nei saggi di stabilità**

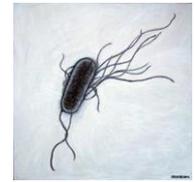
Concentrazione STEC O88	T0 Replica 1		T1 (3 giorni) Replica 1		T2 (7 giorni) Replica 1		T3 (10 giorni) Replica 1		T4 (14 giorni) Replica 1	
	RT PCR	Isolamento	RT PCR	Isolamento	RT PCR	Isolamento	RT PCR	Isolamento	RT PCR	Isolamento
5 CFU/g	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50 CFU/g	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Le caratteristiche dei campioni inviati ai laboratori partecipanti sono riportate nella Tabella 2 e sono state considerate come valori di riferimento per la valutazione dei risultati dello studio.

**Tabella 2: Caratteristiche dei campioni di basilico oggetto dello studio**

Contaminante ( <i>Genotipo</i> )	Livello di contaminazione:		
	Campione 1	Campione 2 (intervallo)	Campione 3 (intervallo)
ED049 STEC O88 ( <i>stx1+</i> , <i>stx2+</i> )	0 CFU	5 CFU/g (4.7-8.3)	50 CFU/g (47-83)

Tre campioni ciascuno composto da 25 g di basilico contaminati come descritto in Tabella 2, confezionati in buste sterili per omogeneizzatore peristaltico, sono stati inviati ai laboratori come campioni in cieco, ciascuno associato a un diverso codice. Il set di codici è stato assegnato in modo casuale ed era diverso per ogni laboratorio. La contaminazione



dei campioni è stata effettuata in data 6 Novembre 2020, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido di un ceppo STEC O88 (ED049) in fase di crescita esponenziale (0,5 OD a 600 nm). Un'incertezza di misura di 0,22 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 non contaminati sono stati analizzati e hanno dato risultati negativi. Sei campioni per ognuno dei tre livelli di contaminazione sono stati scelti in modo casuale per i saggi di omogeneità. Tutti i campioni hanno dato i risultati attesi. I campioni sono stati confezionati per la spedizione a temperatura refrigerata (4°C) e affidati al corriere in data 9 Novembre 2020. I laboratori partecipanti sono stati invitati a iniziare le analisi dei campioni stessi subito dopo il loro ricevimento, riportando la temperatura rilevata all'interno della confezione.

### **3.2 Sottomissione dei risultati mediante servizio online**

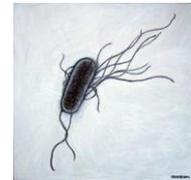
I risultati sono stati sottomessi utilizzando un form online predisposto dall'EURL per *E. coli*. Le istruzioni ed il collegamento per accedere al form sono stati inviati per E-mail a tutti partecipanti.

#### **3.2.1 Assegnazione di punti di penalità ai Laboratori relativamente allo screening dei campioni mediante Real Time PCR**

La competenza di ogni Laboratorio nell'identificazione dei geni codificanti le Shiga tossine nelle colture di arricchimento (*stx1*, *stx2*) è stata valutata assegnando quattro punti di penalità ad ogni risultato errato o mancante. Due punti di penalità sono stati assegnati ai laboratori che hanno identificato nei campioni la presenza del gene *eae*.

#### **3.2.2. Assegnazione di punti di penalità ai Laboratori nell'isolamento dalle colture di arricchimento e caratterizzazione dei ceppi STEC.**

La competenza di ogni Laboratorio nell'isolamento dei ceppi STEC dalle colture di arricchimento dei campioni positivi è stata valutata assegnando due punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo STEC dal campione 2 e del campione 3 e per l'isolamento



del ceppo dal campione negativo (campione 1). 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 hanno identificato in modo non corretto il sierogruppo del ceppo STEC isolato. Non sono state assegnate penalità a quei laboratori che non hanno identificato il sierogruppo del ceppo STEC isolato (ONT) in quanto al di fuori del campo di applicazione del metodo.

### **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**

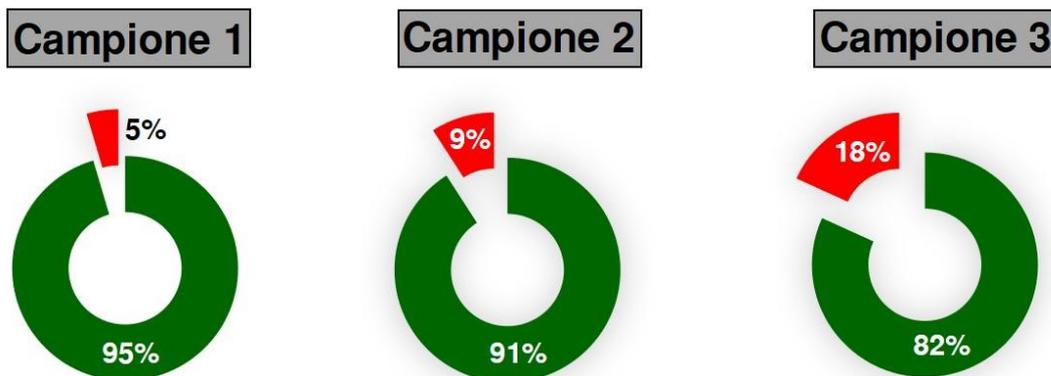
La sensibilità (Se) e la specificità (Sp) sono state calcolate rispettivamente per i passaggi di screening e isolamento. Sensibilità:  $Se = [\text{veri positivi} / (\text{veri positivi} + \text{falsi negativi})] \times 100$   
Specificità:  $Sp = [\text{veri negativi} / (\text{veri negativi} + \text{falsi positivi})] \times 100$ .

## **4. RISULTATI**

Ventuno laboratori hanno ricevuto i campioni entro 24 ore e tre entro 48 ore dalla spedizione. Tutti i Laboratori hanno analizzato i campioni del PT27 entro il periodo di stabilità precedentemente valutato (sezione 3.1). La temperatura riportata dai partecipanti variava tra i 4 e i 18 °C. Ventidue Laboratori hanno sottomesso al LNR *E. coli* i risultati dello studio. I risultati aggregati dello studio sono riportati nelle figure 1-3.



**Figura 1. Screening dei campioni con Real Time PCR:** Percentuale di Laboratori che hanno identificato correttamente la presenza o l'assenza di STEC nei campioni (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato).





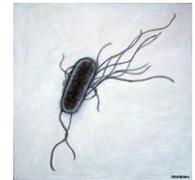
**Figura 2. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento.** Le caselle verdi rappresentano i risultati corretti, quelle rosse i risultati non corretti con evidenziate le determinazioni non corrette. Le caselle in giallo corrispondono ai gold standards (True Value).





**Figura 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC O88 nei campioni di basilico.** Le caselle verdi indicano i risultati corretti (ONT quando il sierogruppo O88 non è stato identificato nei campioni), le caselle rosse indicano i risultati non corretti. In giallo i gold standards (True Value).

Campione 1 (Negativo)		Campione 2 - Livello più basso di contaminazione		Campione 3 - Livello più alto di contaminazione	
True Value	Negativo per STEC	True Value	O88 stx1+ stx2+ eae-	True Value	O88 stx1+ stx2+ eae-
L105		L105	ONT	L105	ONT
L110		L110	ONT	L110	Isolation not achieved
L137		L137	ONT	L137	ONT
L156		L156	ONT	L156	Isolation not achieved
L169		L169	O157 stx1- stx2+ eae-	L169	O157 stx1+ stx2+ eae-
L183		L183	ONT	L183	ONT
L231		L231	ONT	L231	ONT
L293		L293	ONT stx1- stx2+ eae-	L293	ONT stx1- stx2+ eae-
L339	stx1+ stx2+	L339	ONT	L339	ONT
L360		L360	ONT	L360	ONT
L387		L387	ONT	L387	ONT
L460		L460	ONT	L460	ONT
L498		L498	ONT	L498	ONT
L593		L593	ONT	L593	ONT
L626		L626	ONT	L626	ONT
L694		L694	ONT	L694	ONT
L763		L763	ONT	L763	ONT
L834		L834	ONT	L834	ONT
L835		L835	ONT	L835	ONT
L853		L853	ONT	L853	ONT
L931		L931	ONT	L931	ONT
L977		L977	ONT	L977	ONT

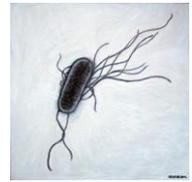


Il calcolo dei valori di Se e Sp relativi alla fase di screening del metodo ha dato i seguenti risultati:

	<b>Se (bassa carica)</b>	<b>Se (alta carica)</b>	<b>Sp</b>
<b>stx1</b>	91.7%	95.6%	95.6%
<b>stx2</b>	100%	100%	95.6%
<b>eae</b>	N.A.	N. A.	95.6%*

\*parametro calcolato sulla base di 66 determinazioni

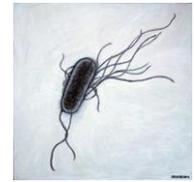
Per quanto riguarda l'isolamento, l'analisi dei risultati ha mostrato una Se del 100 % per il campione a bassa carica e del 91.7% per il campione ad alta carica.



#### **4.1. Valutazione della competenza dei Laboratori**

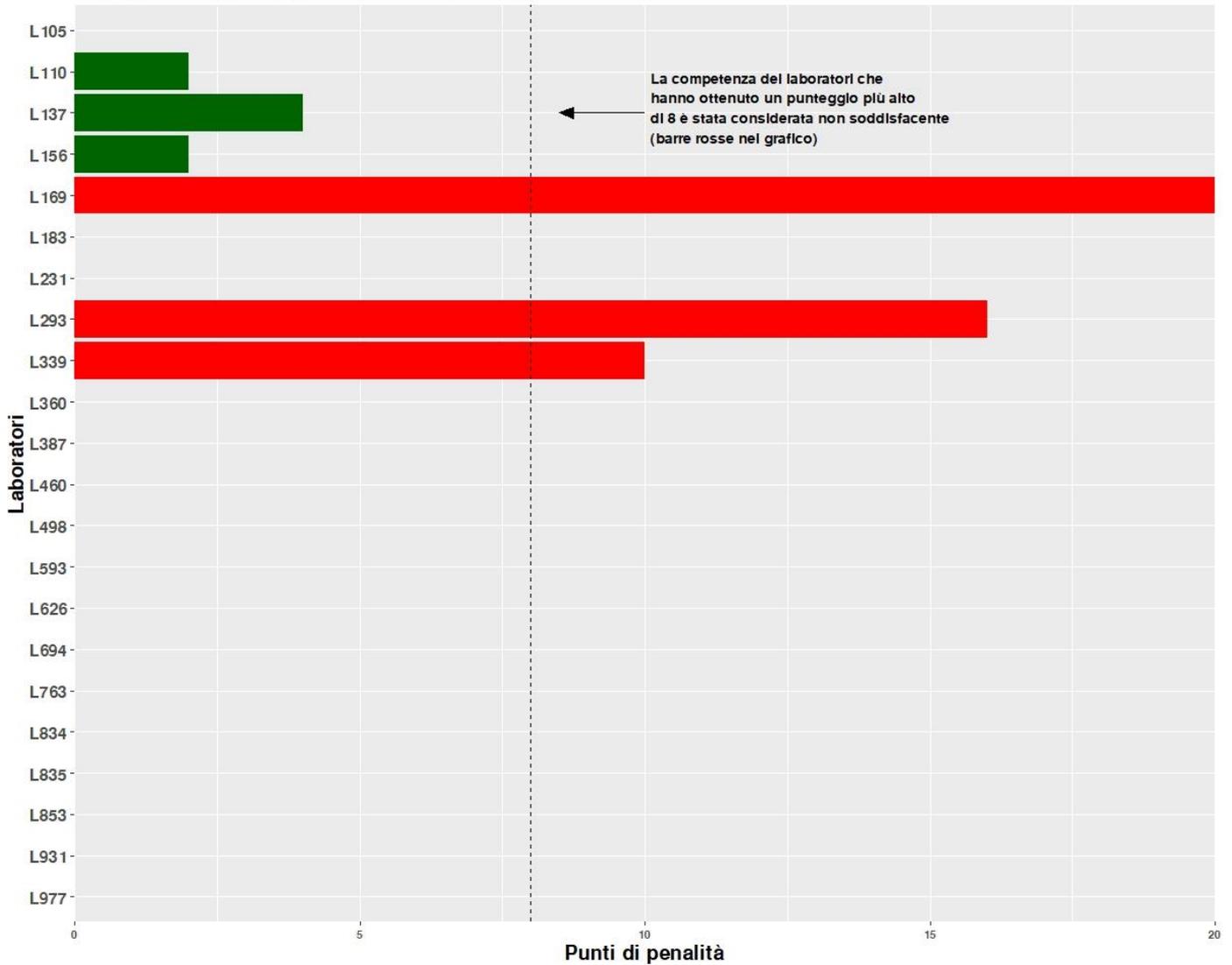
La Figura 4 mostra le penalità ottenute da ogni laboratorio. Dei 22 partecipanti che hanno riportato i risultati, tre non hanno ottenuto una valutazione soddisfacente avendo superato il punteggio di 8.

#### **Figura 4**



### Valutazione della competenza dei Laboratori (screening dei campioni e isolamento)

L'assegnazione dei punti di penalità è descritta nelle sezioni 3.2.1-3.2.2





## 5. CONCLUSIONI

Il PT27 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 O88 nel basilico. Il set analitico era costituito da tre campioni di 25 grammi di basilico ciascuno, con diversi livelli di contaminazione dal ceppo STEC. I risultati hanno mostrato una buona preparazione del network dei laboratori ufficiali italiani. La partecipazione al circuito è stata considerata positivamente considerando anche il periodo di pandemia da COVID-19.

Per tre laboratori è stata identificata una performance non soddisfacente e questi saranno contattati per azioni di follow up.