



**Risultati del 34° test inter-laboratorio nazionale (PT34)
per l'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*
produttori di Shiga-tossina (STEC)
in campioni di acqua di germogliazione - 2022**

A cura di:

Margherita Montalbano Di Filippo, Arianna Boni, Gianfranco Brambilla, Paola Chiani, Federica Gigliucci, Arnold Knijn, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Guendalina Fornari Luswergh, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli, Stefano Morabito



1. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT34 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, procedendo con l'arricchimento a 41.5°C secondo quanto indicato nella procedura EURL-VTEC_Method_09, disponibile al sito web dell' EURL-VTEC.

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 due campioni di acqua di germogliazione, di cui uno contenente un ceppo STEC di sierogruppo O157, incluso nel criterio microbiologico fissato dal Reg. (EU) 209/2013.

2. PARTICIPANTI

Al PT34 hanno aderito 19 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti di seguito elencati. I Laboratori afferivano a 14 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), a 2 Agenzie di Tutela della Salute (ATS), della Brianza e di Milano, rispettivamente, a 2 Agenzie provinciali per l'ambiente (ARPA), di Bolzano e di Udine e ad un'Azienda USL TC di Firenze.

- Agenzia provinciale per l'ambiente e la tutela del clima, Laboratorio biologico, Bolzano
- Agenzia provinciale per l'ambiente, Laboratorio di microbiologia di Udine (ARPA FVG)
- Azienda USL TC, Laboratorio di Sanità Pubblica di Firenze
- ATS della Brianza, Laboratorio di Prevenzione, Oggiono (Lecco)
- 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 Abruzzo e Molise "G. Caporale", Sezione diagnostica provinciale di Pescara



- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Sezione diagnostica provinciale di Campobasso
- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZS Puglia e Basilicata, UO Putignano
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna
- IZS Lazio e Toscana, Roma
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- 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)
- IZS delle Venezie, Sezione di Legnaro (PD)

3. MATERIALI E METODI

3.1. 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 conteneva una flora di background pari a circa 2×10^6 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. Nel dettaglio, ai Laboratori sono stati inviati due campioni, di cui uno potenzialmente contaminato con STEC (1 e 2 nella Tabella 1), costituiti ciascuno da 200 ml di acqua in bottiglie di plastica sterili.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 17 Ottobre 2022, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale ($OD = 0,5$ a 600 nm) del ceppo STEC O157 C210-03, come descritto nella Tabella 1. Il valore dell'incertezza di misura associata all'inoculo utilizzato, calcolato secondo la norma ISO/TS 19036:2006, era $0.24 \log$ UFC/ml.

I campioni sono stati preparati con due diversi livelli di contaminazione: zero, e alta carica,



e contenevano rispettivamente 0 e 100 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. Sono stati eseguiti preliminarmente test di stabilità che hanno mostrato che la presenza del ceppo STEC poteva essere determinata nel campione contaminato con 100 CFU/ml fin dopo 5 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 (Genotipo)	Livello di contaminazione:	
	Campione 1	Campione 2
C210-03 STEC O157 (<i>stx1+</i> ; <i>stx2+</i> , <i>eae+</i>)	-	100 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 17 Ottobre 2022. Ai Laboratori è stata data l'indicazione di iniziare le analisi appena possibile, registrando la temperatura all'arrivo e la data di inizio analisi. Per la verifica dell'omogeneità, 10 repliche di ognuna delle due aliquote test allestite per la spedizione ai Laboratori sono state selezionate casualmente subito dopo la preparazione e analizzate, ottenendo i risultati attesi.

3.2. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I risultati sono stati raccolti attraverso un form online dedicato. Ai laboratori è stato richiesto di fornire nel form il proprio codice di laboratorio (Lab code), fornito in anticipo a ciascuno dei partecipanti, le informazioni sulla data di arrivo, la temperatura e la qualità dei campioni, nonché i risultati ottenuti per ciascun campione.



3.3. 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* e *stx2* nelle colture di arricchimento dei due campioni è stata valutata assegnando quattro 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 *rfbE_{O157}*.

3.4 Valutazione della performance dei Laboratori nell'isolamento del ceppo STEC

La capacità dei Laboratori partecipanti di isolare e caratterizzare il ceppo STEC è stata valutata; in particolare, sono stati assegnati due punti di penalità in caso di mancato isolamento di STEC dal campione 2, e due punti di penalità sono stati assegnati ai laboratori che hanno segnalato l'identificazione di un sierogruppo diverso da quello del ceppo STEC utilizzato per contaminare i campioni (O157).

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 otto punti era associato ad una *performance* non soddisfacente.

3.5 Valutazione delle prestazioni del metodo

La sensibilità (*Se*) e la specificità (*Sp*) sono state calcolate rispettivamente per le fasi 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

I campioni sono stati spediti a 19 Laboratori ufficiali, e tutti i partecipanti hanno riportato i risultati. I campioni sono stati spediti il 17 ottobre 2022 e ricevuti da 16 Laboratori entro le 24 ore e da tre entro le 48 ore. La temperatura alla quale i partecipanti hanno dichiarato di aver ricevuto i campioni variava tra 1.2°C e gli 8°C per 17 Laboratori e tra 13°C e 18.6°C per altri due Laboratori.

I risultati presentati dai laboratori partecipanti sono schematizzati nelle **Figure 1 – 3**.



Figura 1. Percentuale di laboratori che rilevano correttamente i geni nella fase di screening (a) e isolano il ceppo STEC (b) che contamina il campione 2 (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato).

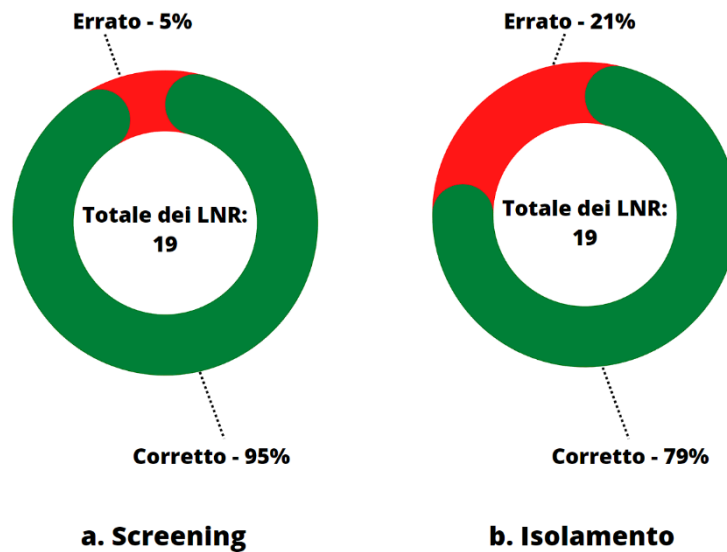


Figura 2. Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogruppo nelle colture di arricchimento (i riquadri gialli rappresentano i gold standard; i riquadri verdi: risultati corretti e i riquadri rossi: risultati errati).

Valore Atteso	Campione Negativo	Valore Atteso	O157 <i>eae+</i> <i>stx1+</i> <i>stx2+</i>
L350	Verde	L350	Verde
L422	Verde	L422	Verde
L501	Verde	L501	Verde
L618	Verde	L618	Verde
L684	Verde	L684	Verde
L702	Verde	L702	Verde
L831	Verde	L831	Verde
L909	Verde	L909	Verde
L988	Verde	L988	Verde
L989	Verde	L989	Verde
L990	Verde	L990	Verde
L991	Verde	L991	Verde
L992	Verde	L992	Verde
L994	Verde	L994	Verde
L995	Verde	L995	Verde
L996	Verde	L996	Verde
L997	Verde	L997	Verde
L998	Verde	L998	Verde
L999	Verde	L999	Verde

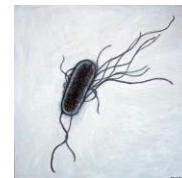


Figura 3. Isolamento e genotipizzazione del ceppo STEC dall'acqua di irrigazione. (Le caselle gialle rappresentano i gold standard; le caselle verdi: risultati corretti e le caselle rosse: risultati errati).

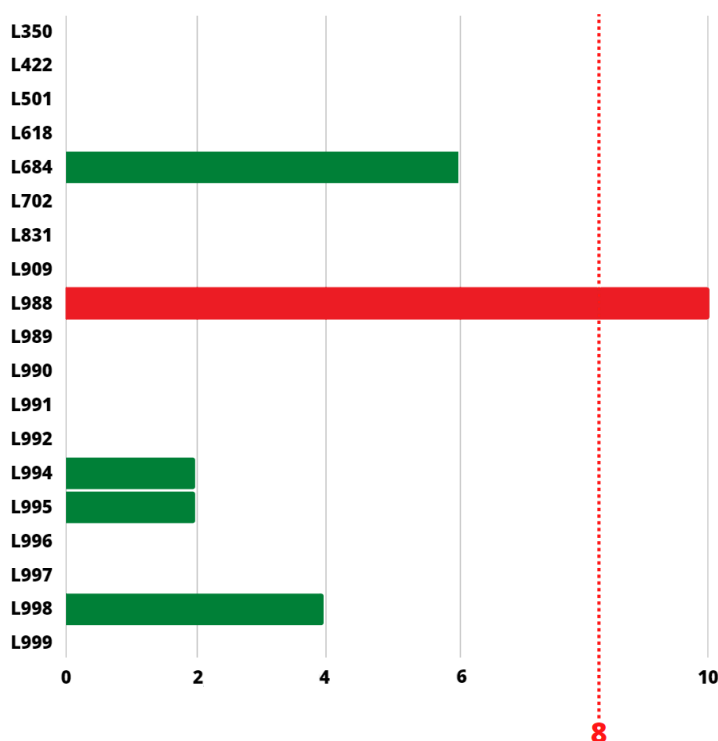
Valore Atteso	Isolamento non eseguito	Valore Atteso	O157 eae+ stx1+ stx2+
L350		L350	
L422		L422	
L501		L501	
L618		L618	
L684		L684	
L702		L702	
L831		L831	
L909		L909	
L988		L988	O157
L989		L989	
L990		L990	
L991		L991	
L992		L992	
L994		L994	Isolamento non raggiunto
L995		L995	Isolamento non raggiunto
L996		L996	
L997		L997	
L998		L998	ONT eae+ stx1+ stx2+
L999		L999	

La *performance* analitica dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 3.3 - 3.4.

La **Figura 4** mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti, assegnati per i risultati non corretti riportati per la fase di screening e di isolamento del ceppo STEC.



Figura 4. Valutazione della *performance* dei Laboratori nella fase di screening e di isolamento. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.3 – 3.4. La *performance* dei laboratori è stata considerata non adeguata per punteggi superiori a 8 (barra rossa).



Il calcolo di *Se* e *Sp* nella fase di screening ha restituito i seguenti risultati:

	Se	Sp
<i>stx1</i>	100%	95%
<i>stx2</i>	100%	100%
<i>eae</i>	100%	95%
<i>rfbE</i>_{O157}	95%	NA

La **Se** della fase di isolamento è stata calcolata al 86.4 %.



5. CONCLUSIONI

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.

Il PT34 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 O157. Il PT34 ha visto la partecipazione di 19 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, e tutti i partecipanti hanno sottomesso i risultati. Il ceppo utilizzato nello studio era un ceppo STEC O157, contaminante i campioni alle seguenti concentrazioni: 0 e 100 UFC/ml. I risultati riportati dai Laboratori partecipanti allo studio hanno mostrato un'ottima performance nell'identificazione del ceppo contaminante nella fase di screening del Campione 2, nel quale il 95 % dei Laboratori partecipanti è stato in grado di identificare i geni *eae*, *stx1*, *stx2*. Un solo Laboratorio partecipante (L988) ha riportato un totale di punti di penalità tali da superare otto, la soglia stabilita per identificare *performance* non soddisfacenti. Tuttavia, lo stesso laboratorio aveva identificato correttamente la presenza di tutti i geni di virulenza nella fase di screening, quindi i punti di penalità potrebbero essere associati ad un non corretto inserimento del risultato piuttosto che a una problematica tecnica di applicazione del metodo. Questo verrà ulteriormente discusso con il laboratorio interessato.

In conclusione, i risultati del PT34 condotto a livello nazionale, hanno messo in evidenza un buon livello del network dei laboratori ufficiali nell'analisi dell'acqua di irrigazione per la presenza di STEC.