



**Risultati del 37° studio inter-laboratorio nazionale  
(PT37) sull'identificazione della presenza di ceppi di  
*E. coli* produttori di Shiga-tossina (STEC)  
in campioni di germogli - 2023**

**A cura di:**

*Arnold Knijn, Rosangela Tozzoli, Paola Chiani, Guendalina Fornari Luswergh, Federica Gigliucci, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Margherita Montalbano Di Filippo, Stefano Morabito*



## 1. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT37 consisteva nell'identificazione e isolamento di un ceppo STEC in tre campioni di germogli.

Gli obiettivi dello studio erano:

- accrescere l'esperienza dei Laboratori nell'analisi dei germogli, 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;
- migliorare la preparazione dei Laboratori Ufficiali nell'identificazione e nell'isolamento di ceppi STEC non appartenenti al sierogruppo O157.

Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione completo dello studio.

## 2. PARTICIPANTI

Al PT37 hanno aderito 19 Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti di seguito elencati. I Laboratori afferivano a 15 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), della Brianza e di Milano, all'Agenzia provinciale per l'ambiente (ARPA) della Valle d'Aosta e all'azienda USL TC di Firenze.

In particolare hanno partecipato i seguenti laboratori:

- ATS Brianza, Oggiono (LC)
- ATS Città Metropolitana di Milano
- ARPA Valle d'Aosta, Aosta
- IZS del Lazio e Toscana, Sede di Roma
- IZS del Lazio e della Toscana LT, Sede di Pisa
- IZS del Mezzogiorno, Sede di Portici
- IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Bologna
- IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Brescia
- IZS Umbria e Marche, Sede di Perugia



- IZS della Puglia e della Basilicata, Sede di Putignano (BA)
- IZS della Puglia e della Basilicata, Sede di Foggia
- Laboratorio di Sanità Pubblica Firenze - Azienda USL TC, Firenze
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino
- IZS della Sicilia, Sede di Palermo
- IZS della Sicilia, Sede di Catania
- IZS dell'Umbria e delle Marche, sede di Fermo
- IZS delle Venezie, Sede di Legnaro (PD)
- IZS delle Venezie, Sede di Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, Sede di Trento

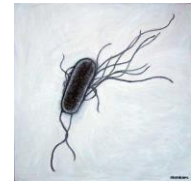
### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Preparazione dei campioni

Tre campioni di prova incogniti (1, 2 e 3), ciascuno costituito da 25 g di germogli di erba medica potenzialmente contaminati da STEC, sono stati inviati in cieco ai Laboratori partecipanti.

I germogli utilizzati sono stati acquistati come lotto unico da un produttore locale e contenevano una microflora batterica naturale pari a  $9,3 \times 10^4$  CFU/g di germogli ( $10^4$  CFU di enterobatteri per grammo di germogli). I germogli sono stati porzionati in campioni da 25 g in sacchetti da stomacher sterili e posti a + 4°C fino all'esecuzione della contaminazione artificiale. Due porzioni da 25 g di germogli dello stesso lotto sono state inizialmente testate per la presenza di STEC applicando il metodo ISO TS 13136:2012. Entrambi i campioni erano negativi allo screening per tutti i geni bersaglio.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 20 ottobre 2023, utilizzando opportune diluizioni di una coltura liquida esponenziale ( $OD_{600}$  pari a 0,5) del ceppo STEC ED0773 (O187:H28) che possiede il gene *stx2* ed è negativo per la presenza del gene *eae*. Le caratteristiche dei campioni sono riportate in Tabella 1. All'inoculo standardizzato è stata associata un'incertezza di misura pari a 0,19 log CFU/ml, calcolata secondo quanto riportato nella procedura descritta nella norma ISO TS 19036:2006. I tre campioni corrispondevano a tre diversi livelli di contaminazione: zero, basso e alto (Tabella 1). Diluizioni seriali delle



sospensioni di inoculo del ceppo ED0773 utilizzate per la contaminazione dei campioni sono state piastrate su MacConkey agar per confermare il titolo.

I campioni incogniti sono stati etichettati con codici numerici generati casualmente, diversi per ciascun laboratorio, e sono stati conservati a +4°C fino alla spedizione refrigerata il 23 ottobre 2023 effettuata tramite corriere. Ai Laboratori è stato richiesto di registrare la data di consegna e la temperatura del campione al momento del ricevimento e di avviare le analisi immediatamente.

**Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di germogli utilizzati nello studio**

Contaminante ( <i>Genotipo</i> )	Livello di contaminazione:		
	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Ceppo ED0773, STEC O187:H28 ( <i>stx1</i> <sup>-</sup> , <i>stx2</i> <sup>+</sup> , <i>eae</i> <sup>-</sup> )	-	Bassa carica: 5 CFU/g	Alta carica: 50 CFU/g

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state valutate secondo i requisiti della norma ISO 17043:2010.

La stabilità è stata valutata utilizzando campioni contaminati il 13 settembre 2023 e testati secondo ISO TS 13136:2012 dopo 0, 5, 7 e 12 giorni dalla contaminazione iniziale. Lo screening Real Time PCR è risultato positivo per i geni target STEC anche dopo 12 giorni. L'isolamento ha avuto successo per tutti i campioni corrispondenti all'alto livello di contaminazione in tutti i punti temporali, mentre non è stato ottenuto per il livello di contaminazione basso già dopo 5 giorni.

Al momento della preparazione dei campioni di prova, sono state selezionate in modo casuale dieci buste per ciascuno dei due livelli di contaminazione e due campioni di prova non contaminati per il test di omogeneità, arricchiti a +37°C e analizzati il 24 ottobre 2023 mediante Real Time PCR per identificare la presenza dello STEC, ottenendo i risultati attesi

### 3.2. Metodi di Laboratorio

Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di identificare la presenza di STEC utilizzando il metodo ISO TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento fornito dal laboratorio di



riferimento dell'UE per *E. coli* (EURL-VTEC) per la rilevazione specifica di STEC O104:H4 (EU RL VTEC\_Method\_04\_Rev 1: "Identificazione di *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) O104:H4 negli alimenti mediante Real Time PCR").

### **3.3. Raccolta ed elaborazione dei risultati**

I risultati sono stati raccolti attraverso un *form online* dedicato. Ai partecipanti è stato richiesto di indicare 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 lo stato dei campioni, nonché i risultati ottenuti per ciascun campione.

### **3.4. 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.

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

Le prestazioni di ciascun Laboratorio nell'isolare e caratterizzare il ceppo STEC sono state valutate assegnando due punti di penalità in caso di mancato isolamento di STEC dai campioni 2 e 3.

### **3.5 Valutazione della prestazione dei Laboratori nell'intera procedura**

La somma dei punti di penalità ottenuti nelle diverse fasi della procedura ha dato origine ad un punteggio totale, utilizzato per valutare la prestazione complessiva dei Laboratori partecipanti. La performance dei Laboratori che hanno ottenuto un punteggio superiore a otto è stata considerata insoddisfacente.

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

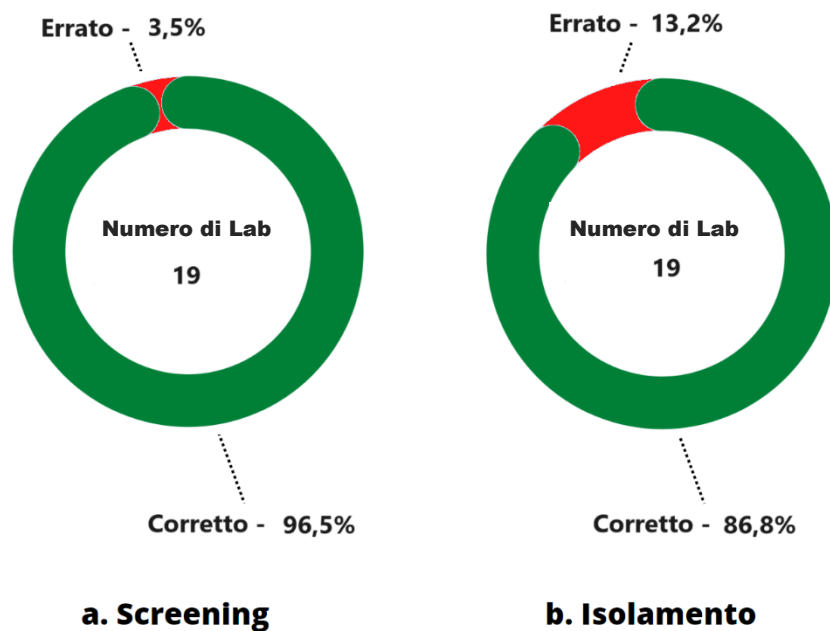
#### 4. RISULTATI

I campioni sono stati spediti ai 19 Laboratori ufficiali, e tutti i partecipanti hanno riportato i risultati.

I campioni sono stati spediti il 23 ottobre 2023 e ricevuti da 16 Laboratori entro le 24 ore e da tre entro le 48 ore. Cinque Laboratori non hanno riportato la temperatura dei campioni alla ricezione, tuttavia hanno dichiarato che i campioni erano arrivati refrigerati e in buone condizioni. Per la maggior parte dei laboratori che hanno registrato la temperatura, questa variava tra 3°C e i 9°C. Un Laboratorio ha ricevuto i campioni alla temperatura di 10°C ed un altro a 0.4°C.

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

**Figura 1. Percentuale di laboratori che hanno rilevato 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).**

Campione 1		Campione 2- bassa carica		Campione 3 – alta carica	
Valore atteso	Campione negativo	Valore atteso	<i>stx2</i>	Valore atteso	<i>stx2</i>
L011	Green	L011	Green	L011	Green
L020	Green	L020	Red ( <i>stx1; stx2</i> )	L020	Red ( <i>stx1; stx2</i> )
L021	Green	L021	Green	L021	Green
L023	Green	L023	Green	L023	Green
L024	Green	L024	Green	L024	Green
L028	Green	L028	Green	L028	Green
L350	Green	L350	Green	L350	Green
L422	Green	L422	Green	L422	Green
L501	Green	L501	Green	L501	Green
L702	Green	L702	Green	L702	Green
L831	Green	L831	Green	L831	Green
L909	Green	L909	Green	L909	Green
L989	Green	L989	Green	L989	Green
L990	Green	L990	Green	L990	Green
L991	Green	L991	Green	L991	Green
L996	Green	L996	Green	L996	Green
L997	Green	L997	Green	L997	Green
L998	Green	L998	Green	L998	Green
L999	Green	L999	Green	L999	Green

**Figura 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC dai campioni di germogli. (Le caselle gialle rappresentano i gold standard; le caselle verdi: risultati corretti e le caselle rosse: risultati errati).**

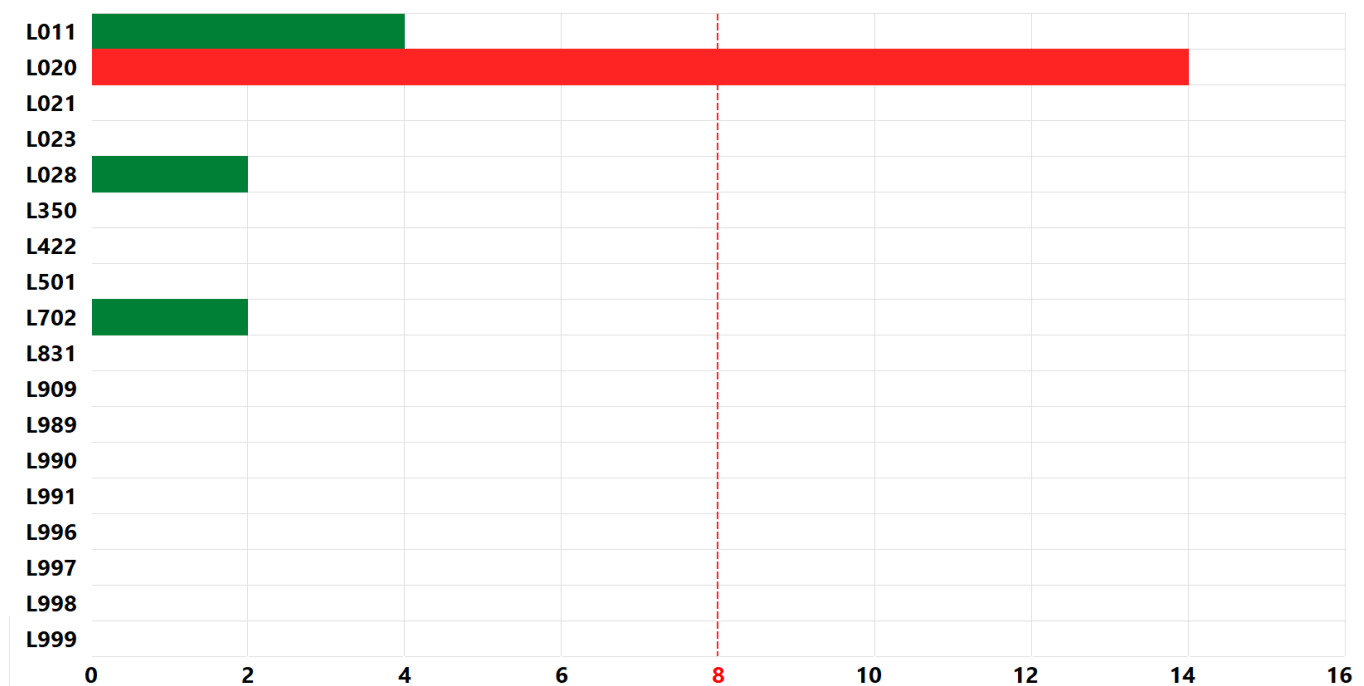
Campione 1		Campione 2- bassa carica		Campione 3 – alta carica	
Valore atteso	Isolamento non eseguito	Valore atteso	<i>stx2</i> ; OND (O187)	Valore atteso	<i>stx2</i> ; OND (O187)
L011	Grey	L011	Red (isolamento non raggiunto)	L011	Red (isolamento non raggiunto)
L020	Grey	L020	Red ( <i>stx1; stx2</i> )	L020	Red (isolamento non raggiunto)
L021	Grey	L021	Green	L021	Green
L023	Grey	L023	Green	L023	Green
L024	Grey	L024	Green	L024	Green
L028	Grey	L028	Green	L028	Red (isolamento non raggiunto)
L350	Grey	L350	Green	L350	Green
L422	Grey	L422	Green	L422	Green
L501	Grey	L501	Green	L501	Green
L702	Grey	L702	Red (isolamento non raggiunto)	L702	Green
L831	Grey	L831	Green	L831	Green
L909	Grey	L909	Green	L909	Green
L989	Grey	L989	Green	L989	Green
L990	Grey	L990	Green	L990	Green
L991	Grey	L991	Green	L991	Green
L996	Grey	L996	Green	L996	Green
L997	Grey	L997	Green	L997	Green
L998	Grey	L998	Green	L998	Green
L999	Grey	L999	Green	L999	Green



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 ai paragrafi 3.4 – 3.5. 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:

	Campione 1		Campione 2		Campione 2	
	Sp	Se	Sp	Se	Sp	
<b>stx1</b>	100%	100%	NA	100%	NA	
<b>stx2</b>	100%	NA	95%	NA	95%	
<b>eae</b>	NA	NA	100%	NA	100%	





La **Se della fase di isolamento** è stata calcolata al 89.5 % per il campione 2 (bassa carica) e 84.2% per il campione 3 (alta carica).

## 5. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio era di identificare la presenza di STEC in campioni di germogli, l'unica matrice per la quale esiste un criterio microbiologico per STEC (Reg. (UE) 209/2013). I risultati del PT37 mettono in evidenza un'elevata partecipazione da parte dei Laboratori coinvolti nel controllo Ufficiale degli alimenti, e delle ottime prestazioni nell'identificazione del ceppo STEC contaminante. Un solo Laboratorio partecipante (L020) 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 STEC nei campioni 2 e 3, riuscendo ad isolare almeno in uno dei due campioni anche il ceppo contaminante.

In conclusione, i risultati del PT37 condotto a livello nazionale, hanno messo in evidenza un ottimo livello del network dei laboratori ufficiali nell'analisi dei germogli per la presenza di *Escherichia coli* produttori di Shiga Tossina.