Laboratorio Nazionale di Riferimento per *E. coli*
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare
Istituto Superiore di Sanità

Risultati del 40° studio inter-laboratorio (PT40) sull'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli* produttori di Shiga-tossina (STEC) in campioni di acqua di germogliazione - 2024

A cura di:

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

1. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Il PT40 consisteva nell'identificazione e isolamento di un ceppo di *Escherichia coli* produttore di Shiga Tossina (STEC) in due campioni di acqua di germogliazione.

Gli obiettivi dello studio erano:

- accrescere l'esperienza dei Laboratori Ufficiali nell'analisi di acqua di germogliazione, 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 del metodo ISO/TS 13136:2012;
- migliorare la preparazione dei Laboratori Ufficiali nell'identificazione e l'isolamento di ceppi STEC non appartenenti al sierogruppo O157

Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione completo dello studio organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per *E. coli*.

2. PARTECIPANTI

Diciassette Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT40. I Laboratori afferivano a otto Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), due Agenzie di Tutela della Salute (ATS) e un laboratorio di sanità pubblica (azienda USL).

In particolare, hanno partecipato i seguenti laboratori:

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata sez. di Putignano
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata - Foggia
- Laboratorio di Sanità Pubblica Firenze - Azienda USL TC
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" Teramo
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Mezzogiorno, Portici
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sede Territoriale

di Bologna

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sede Territoriale di Brescia

- Laboratorio di Prevenzione ATS Brianza, Oggiono (Lecco)

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G.Caporale Sezione diagnostica provinciale di Pescara

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G.Caporale, Sezione diagnostica provinciale di Campobasso

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia

- ATS Milano Città Metropolitana

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Genova

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana M. Aleandri, Roma

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta- S.C. Biotecnologie Applicate e Produzioni, Torino

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta- S.C. Sicurezza e Qualità degli Alimenti, Torino

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

Due campioni di prova incogniti, costituiti ciascuno da 200 ml di acqua di germogliazione di erba medica potenzialmente contaminata da STEC, sono stati inviati ai Laboratori partecipanti.

L'acqua di germogliazione utilizzata è stata reperita in un lotto unico da un produttore locale e conteneva una microflora batterica naturale pari a 10^7 CFU/ml di acqua di germogliazione (1,8 x 10^6 CFU di enterobatteri per millilitro di acqua di germogliazione). L'acqua di germogliazione, utilizzata nel ciclo di produzione di germogli di erba medica, è stata suddivisa in singoli campioni da 200 ml in bottiglie di plastica con tappo a vite conservati a +4 °C fino

all'esecuzione della contaminazione artificiale. Due campioni da 200 ml di acqua di germogliazione dello stesso lotto sono stati inizialmente saggiati per la presenza di STEC applicando il metodo ISO TS 13136:2012 dopo il pretrattamento descritto nelle istruzioni fornite ai partecipanti (centrifugazione dei 200 ml a 5000 rpm per 30 min a +4°C e risospensione del pellet in 10X il volume del pellet con acqua peptonata tamponata, BPW) e arricchimento in BPW a 41.5°C per 18-24 ore. Entrambi i campioni sono risultati negativi allo screening per tutti i geni bersaglio.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il giorno 11 ottobre 2024, utilizzando opportune diluizioni di una coltura liquida in fase esponenziale (0,5 OD_{600}) del ceppo STEC ED0963 (O104:H7) che possiede il gene *stx1* ed è negativo per la presenza del gene *eae*. Le caratteristiche dei campioni inviati ai laboratori sono riportate in Tabella 1. All'inoculo standardizzato è stata associata un'incertezza di misura pari a 0,125 log CFU/ml, calcolata secondo quanto prescritto nella norma ISO TS 19036:2006. I due campioni corrispondevano a due diversi livelli di contaminazione: 0 e 50 CFU/ml (Tabella 1). Diluizioni seriali delle sospensioni di inoculo del ceppo ED0963 utilizzate per la contaminazione dei campioni sono state seminate su piastre di MacConkey agar per confermare il titolo.

I campioni sono stati etichettati con codici numerici generati casualmente, e diversi per ciascun laboratorio, e sono stati conservati a +4 °C fino alla spedizione refrigerata il 14 Ottobre 2024 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 il prima possibile e comunque entro le 18 ore dall'avvenuto ricevimento.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di acqua di germogliazione utilizzati nello studio

Contaminante (*Genotipo*)	**Livello di contaminazione in:**	
	Campione 1	**Campione 2**
Ceppo ED0963, STEC O104:H7 *(stx1+, stx2-, eae-*)	-	50 CFU/ml

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 dell'acqua utilizzata per la produzione della stessa specie di germogli ma di un lotto precedente, contaminati artificialmente il 16 Luglio 2024 e analizzati con il metodo ISO TS 13136:2012, dopo aver applicato la procedura di pretrattamento come prima descritto. Le prove di stabilità sono state eseguite dopo 0, 3, 7 e 9 giorni dalla contaminazione iniziale. Le prove effettuate hanno mostrato che lo screening in Real Time PCR era positivo per i geni target del ceppo STEC utilizzato nelle contaminazioni anche dopo 9 giorni, mentre era possibile isolare il ceppo STEC entro i 7 giorni dalla contaminazione del campione.

Al momento della preparazione dei campioni di prova, sei bottiglie per ciascuno dei due livelli di contaminazione (0 e 50 CFU/ml) sono state selezionate in modo casuale per valutarne l'omogeneità, pretrattati come da procedura indicata, arricchiti in BPW e incubati a 41.5 °C. I campioni sono stati analizzati il 15 ottobre 2024 mediante Real Time PCR per identificare la presenza del ceppo STEC, ottenendo i risultati attesi.

3.2. Metodi di Laboratorio

Ai laboratori è stato richiesto di identificare la presenza di STEC utilizzando la procedura di pre-trattamento dei campioni disponibile sul sito web del laboratorio di riferimento dell'UE per *E. coli* (EURL-VTEC_Method_09_Rev 1: "*Laboratory procedure for testing spent irrigation water for the presence of STEC*"), seguita dal metodo ISO TS 13136:2012, eseguendo l'arricchimento dei campioni in acqua peptonata a 41.5 °C e tenendo conto dell'adattamento fornito dall'EURL per *E. coli* per la rilevazione specifica di STEC O104:H4 (EU RL VTEC_Method_04_Rev2: "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 sito web dedicato sviluppato dall'EURL per *E. coli*. Ai laboratori è stato richiesto di fornire informazioni sulla data di arrivo e la qualità dei campioni, nonché i risultati ottenuti per ciascun campione.

3.4 Analisi dei risultati dei laboratori partecipanti

3.4.1 Valutazione della *performance* dei Laboratori nella fase di *screening* in Real

Time PCR

Le prestazione di ciascun Laboratorio nell'identificazione dei geni bersaglio nelle colture di arricchimento è stata valutata assegnando quattro punti di penalità a ciascun risultato errato o mancante riguardante l'identificazione dei geni *stx* e due punti di penalità per l'errata identificazione del gene *eae* e del sierogruppo O104.

3.4.2 Valutazione della *performance* dei Laboratori nell'isolamento del ceppo STEC dalle colture di arricchimento risultate positive in PCR

Le prestazioni di ciascun Laboratorio nell'isolare e caratterizzare il ceppo STEC responsabile per la positività osservata nella fase di *screening* in PCR sono state valutate assegnando due punti di penalità in caso di mancato isolamento di STEC dal campione 2. Inoltre, per la caratterizzazione del ceppo STEC isolati sono stati assegnati quattro punti di penalità per l'errata identificazione dei geni *stx* e due punti di penalità in caso di errore nell'identificazione del sierogruppo O104.

3.4.3 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 nel PT. La prestazione dei laboratori che hanno ottenuto un punteggio superiore a otto è stata considerata insoddisfacente.

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* = [veri positivi / (veri positivi + falsi negativi)] x 100

Specificità: *Sp* = [veri negativi / (veri negativi + falsi positivi)] x 100

4. RISULTATI

I campioni sono stati spediti ai 17 Laboratori partecipanti, e 16 di questi hanno riportato i risultati. I campioni sono stati ricevuti entro 24 ore in buone condizioni da tutti i laboratori, ad eccezione di due laboratori: L028, che ha ricevuto i campioni dopo 48 ore e ha riportato le condizioni come sufficienti, e L010, che ha ricevuto i campioni in scarse condizioni quattro giorni dopo l'invio e non ha avuto la possibilità di registrarne la temperatura.

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 isolato il ceppo STEC (b) presente nel campione 2 (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato).

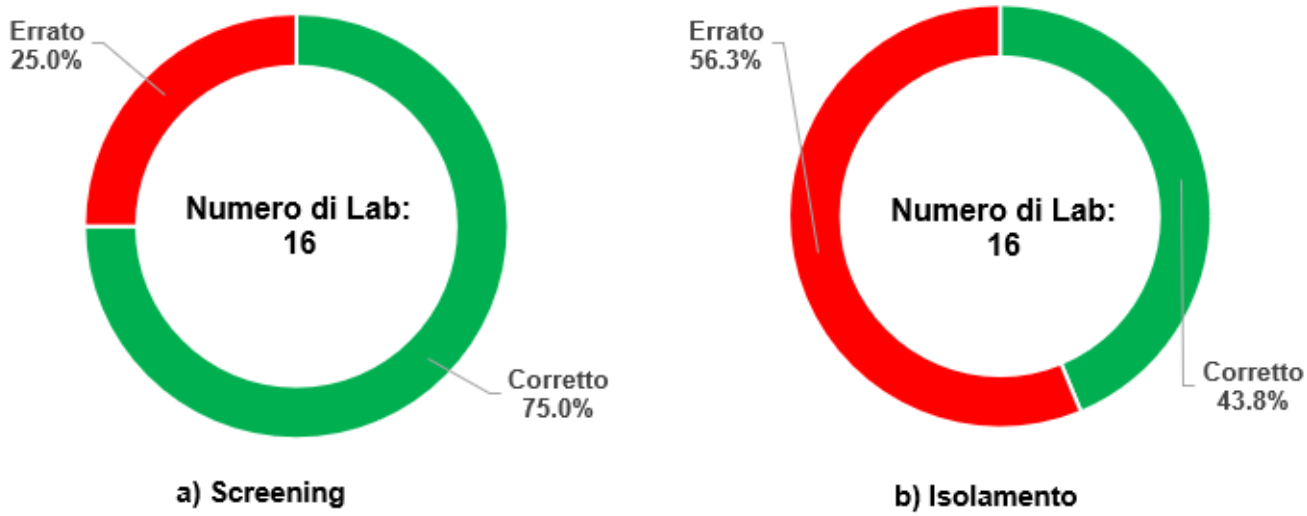


Figura 2. Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogruppo nelle colture di arricchimento (i riquadri gialli rappresentano il *gold standard*; i riquadri verdi: risultati corretti e i riquadri rossi: risultati errati).

	Campione 1	Campione 2
Valore atteso	Campione negativo	*stx1;* O104
L009		*stx1; stx2; O104*
L010	*eae; -*	-
L028		*stx1; -*
L350		
L422		
L501		
L702		
L831		*stx1; -*
L909		
L989		
L991		
L992		*stx1; -*
L994		*stx1; -*
L995		*stx1; -*
L996		
L997		

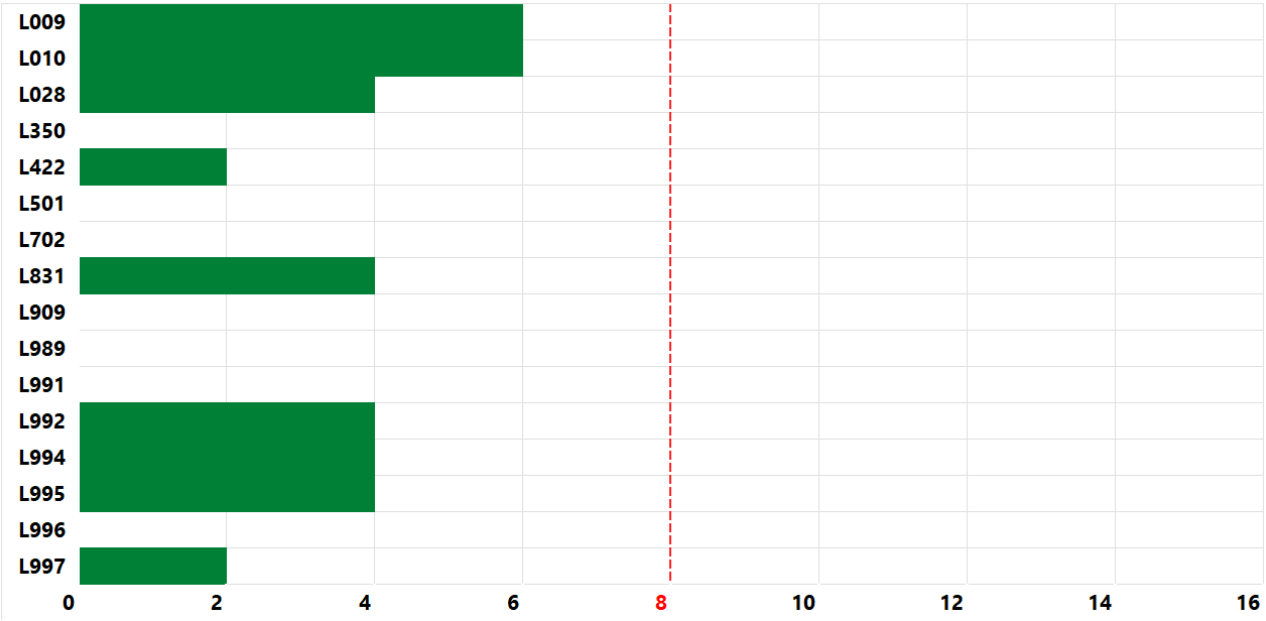
Figura 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC dai campioni di germogli. (Le caselle gialle rappresentano il *gold standard*; le caselle verdi: risultati corretti e le caselle rosse: risultati errati).

	Campione 1	Campione 2
Valore atteso	Isolamento non eseguito	*stx1;* O104
L009		isolamento non raggiunto
L010		isolamento non eseguito
L028		*stx1; -*
L350		
L422		isolamento non raggiunto
L501		
L702		
L831		isolamento non raggiunto
L909		
L989		
L991		
L992		isolamento non raggiunto
L994		isolamento non raggiunto
L995		isolamento non raggiunto
L996		
L997		isolamento non raggiunto

La *performance* analitica dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 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 calcolo di ***Se* e *Sp* nella fase di *screening*** ha restituito i seguenti risultati:

	Se	***Sp***
stx1	100%	100%
stx2	NA	96.9%
eae	NA	96.9%
wzx$_{O104}$	66.7%	NA

La ***Se* della fase di isolamento** calcolata è pari al 53.3%.

5. Conclusioni

Il PT40 consisteva nell'identificare la presenza di STEC in campioni di acqua di germogliazione, matrice che può essere analizzata per controllare l'assenza di STEC O157, O26, O103, O145 e O104:H4 nei germogli secondo il criterio microbiologico prescritto dal regolamento Reg. (UE) 209/2013. I risultati del PT40 mettono in evidenza un'elevata partecipazione da parte dei Laboratori coinvolti nel controllo Ufficiale degli alimenti e ottime prestazioni nell'identificazione della contaminazione dei campioni analizzati. Tutti i Laboratori partecipanti hanno dimostrato una performance soddisfacente, riportando un totale di punti di penalità inferiore a otto. Un solo Laboratorio (L010) non ha identificato la presenza dei geni *stx* nella fase di screening, tuttavia è da sottolineare che questo Laboratorio aveva ricevuto in campioni scarse condizioni quattro giorni dopo l'invio. Circa la metà dei Laboratori partecipanti non ha raggiunto l'isolamento del ceppo STEC dal campione 2, probabilmente a causa de limite di rilevabilità (LOD_{50}) della procedura utilizzata con questo tipo di matrice, che è stato stimato a 24 CFU/ml mediante l'analisi dei dati di partecipazione al PT organizzato dall'EURL per *E. coli* (link).

In conclusione, i risultati del PT40 condotto a livello nazionale hanno messo in evidenza un ottimo livello del network dei laboratori ufficiali nell'analisi di acqua di germogliazione per la presenza di STEC.