



**Risultati del 15° test inter-laboratorio nazionale (PT15)  
per l'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli*  
produttori di verocitotossina (VTEC)  
in campioni di germogli - 2015**

**A cura di:**

*Susan Babsa, Alfredo Caprioli, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Fabio Galati, Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Stefano Morabito, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli*

## 1. INTRODUZIONE

Il Regolamento (UE) No. 209/2013 sui criteri microbiologici applicabili ai germogli destinati al consumo umano diretto ha introdotto per la prima volta un criterio microbiologico relativo ai VTEC. Il Regolamento prevede l'assenza di VTEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 in 25 g di prodotto e prescrive per la loro ricerca l'uso del metodo ISO/TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'*EU Reference Laboratory for E. coli* (EU-RL VTEC) per rilevare la presenza di VTEC O104:H4.

Il metodo ISO/TS 13136:2012 è stato già impiegato nei sette precedenti studi inter-laboratorio sulla ricerca nei VTEC negli alimenti organizzati tra il 2008 e il 2014 dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, dei quali gli ultimi due (PT12 e PT14) sono stati condotti proprio sui germogli. Anche l'ottavo PT sugli alimenti (PT15) ha riguardato questa matrice e la scelta è dovuta alle seguenti ragioni:

- I germogli sono un alimento pronto al consumo che continua a essere associato a focolai epidemici di infezione da Salmonella e VTEC.
- Il Regolamento (EU) 209/2013, in vigore dal 1° Luglio 2013, richiede che i laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti abbiano il metodo ISO TS 13136:2012 accreditato e siano pronti ad analizzare i germogli per la presenza di VTEC.

Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferimento (EU-RL) per questo microrganismo, lo studio nazionale è stato condotto contestualmente a quello dedicato agli LNR per *E. coli* degli Stati Membri della UE, che ha visto la partecipazione di 36 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare. Il report dello studio europeo è disponibile al sito web dell'EU-RL (<http://www.iss.it>) nella sezione *Proficiency Tests*.

## 2. OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

L'obiettivo dello studio è stato quello di accrescere l'esperienza dei laboratori nell'uso del metodo molecolare standard per la ricerca dei VTEC e, in particolare, migliorare il loro livello di preparazione nell'analisi dei germogli, una matrice per cui il Reg. (UE) 209/2013 ha stabilito un criterio microbiologico specifico per i VTEC.

### **3. PARTECIPANTI**

Al PT hanno aderito 18 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti di seguito elencati. I laboratori afferivano a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) e alla ASL della Provincia di Lecco.

- ASL Provincia di Lecco, Laboratorio di Prevenzione, Oggiono (LC)
- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", 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, Roma
- IZS del Mezzogiorno, UO Microbiologia Alimentare, Sezione di Salerno, Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O.S. "Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM", Portici (NA)
- 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 Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo (FM)
- IZS Umbria Marche, Sezione di Pesaro
- IZS delle Venezie, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, SC Analisi del rischio e sorveglianza in sanità pubblica, Legnaro (PD)

### **4. MATERIALI E METODI**

#### **4.1. Preparazione dei campioni**

I germogli utilizzati nello studio erano una miscela commerciale confezionata per la vendita al dettaglio, costituita per il 90 % da erba medica (alfa-alfa) e per il 10 % da crescione. I germogli contenevano una flora microbica naturale (circa  $9 \times 10^7$  CFU/g) ed erano negativi ai test PCR effettuati per la ricerca dei geni bersaglio oggetto del PT.

Ai Laboratori sono stati inviati tre campioni (A, B e C), costituiti da 25 g di germogli potenzialmente contaminati con VTEC.

La contaminazione artificiale dei campioni, contenuti in sacchetti da *stomacher*, è stata effettuata il 17 Aprile 2015, utilizzando diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale (OD = 0,5 a 600 nm) del ceppo di VTEC O111 descritto nella Tabella 1. Il valore dell'incertezza di misura associata all'inoculo utilizzato, calcolato secondo la norma ISO/TS 19036:2006, era 0,138 log CFU.

I campioni sono stati preparati con tre diversi livelli di contaminazione: zero, basso (vicino al limite di rilevabilità stimato per la fase di isolamento del metodo) e alto; essi contenevano rispettivamente 0, 100 (73-137) e 1.000 (727-1.374) CFU per grammo di germogli del ceppo VTEC. Il titolo dell'inoculo è stato verificato seminando diluizioni seriali su piastre di agar MacConkey. La concentrazione dell'analita nei campioni è stata decisa sulla base dei risultati dei test di stabilità (screening PCR e isolamento) condotti nell'arco di 12 giorni dopo la contaminazione dei campioni. E' stata anche valutata la possibilità di usare un livello di contaminazione pari a circa 10 CFU/g, ma questa concentrazione è stata esclusa dopo che i test PCR condotti 10 giorni dopo la contaminazione hanno dato risultati negative.

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**

<b>Contaminante (Genotipo)</b>	<b>Livello di contaminazione nel:</b>		
	<b>Campione A</b>	<b>Campione B</b>	<b>Campione C</b>
VTEC O111 ( <i>vtx1+</i> , <i>vtx2+</i> , <i>eae+</i> )	Alto: 1.000 (727-1,374) CFU/g	Basso: 100 (73-137) CFU/g	Zero

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

20 Aprile. Ai Laboratori è stata data l'indicazione di iniziare le analisi appena possibile, registrando la temperatura all'arrivo e la data di inizio analisi.

#### **4.2. Stabilità e omogeneità dei campioni**

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state verificate secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010.

Per la verifica della stabilità, un gruppo di campioni contaminati è stato preparato come descritto nel paragrafo precedente. I campioni sono stati conservati a 4 °C e analizzati mediante Real Time PCR dopo 3, 6 e 13 giorni dalla preparazione, sempre ottenendo i risultati attesi.

Per la verifica dell'omogeneità, 10 repliche di ognuna delle tre aliquote test allestite per la spedizione ai laboratori sono state selezionate casualmente subito dopo la preparazione e analizzate, ottenendo i risultati attesi.

#### **4.3. Metodi di laboratorio**

Secondo quanto prescritto dal Reg. (EU) 209/2013, ai laboratori partecipanti è stato chiesto di ricercare la presenza di VTEC O157, O111, O26, O103, O145 e O104:H4, utilizzando lo standard ISO/TS 13136:2012 e la procedura prodotta dall'EU-RL per *E. coli* per la ricerca di VTEC O104:H4 (disponibile su [www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec), sezione *Laboratory Methods*). Considerando che i contaminanti dei germogli sono in genere sottoposti a condizioni di stress, ai Laboratori è stata data l'indicazione di utilizzare *buffered peptone water* (BPW) come terreno di arricchimento.

Le procedure sopra menzionate sono anche state indicate per isolare e caratterizzare i ceppi VTEC responsabili delle reazioni PCR positive.

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

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando pagine dedicate accessibili attraverso la *Restricted Area* del sito web dell'EU-RL VTEC ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)), previa introduzione di *User ID* e *Password*, inviate a ogni laboratorio insieme al codice identificativo e alle istruzioni necessarie per il *log in*. Al termine del test, i partecipanti hanno avuto la possibilità di stampare direttamente il proprio *test-report* con i risultati inviati e quelli attesi.

## **4.5. Analisi dei risultati**

### **4.5.1. Valutazione della performance dei laboratori nella fase di screening delle colture di arricchimento mediante Real Time PCR**

La *performance* nell'identificazione dei geni di virulenza e sierogruppo-associati è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per ogni risultato errato o mancante.

### **4.5.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'isolamento e la caratterizzazione del ceppo VTEC O111**

La *performance* è stata valutata assegnando 4 punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo di VTEC O111 dal campione A (alto livello di contaminazione) e per ogni risultato errato o mancante nella sua caratterizzazione. Non sono stati invece assegnati punti di penalità per il mancato isolamento del ceppo VTEC O111 dal campione B (basso livello di contaminazione), in quanto il livello era vicino al limite di rilevabilità stimato per il metodo.

### **4.5.3. Valutazione della performance dei laboratori nell'intera procedura**

La somma dei punti di penalità assegnati nelle due fasi precedenti ha generato un punteggio totale, usato per valutare la performance di ogni laboratorio. In particolare, un punteggio superiore a 8 punti ha identificato una performance non adeguata.

## **5. RISULTATI**

I campioni, inviati il 20 Aprile, sono stati recapitati a 13 Laboratori entro 24 ore, a 4 laboratori entro 48 ore e a un laboratorio entro 72 ore. La temperatura all'arrivo riportata era compresa tra 2 °C e 8 °C per 17 laboratori ed era 18,5 °C per un laboratorio.

I risultati sono stati inviati da 17 laboratori.

### **5.1. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento mediante Real Time PCR**

La Tabella 2 riporta i risultati della ricerca dei geni di virulenza nelle colture di arricchimento mediante Real-Time PCR.

Tutti i 17 laboratori che hanno inviato i risultati hanno effettuato la ricerca dei geni di virulenza associati ai VTEC (*vtx1*, *vtx2* ed *eae*), riportandone correttamente la presenza/assenza in tutti i campioni. Tutti i laboratori hanno anche identificato correttamente la presenza del gene marcatore del sierogruppo O111 in entrambi i campioni contaminati.

**Tabella 2. Ricerca dei geni di virulenza e sierogruppo-specifici nelle colture di arricchimento.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati o mancanti.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza e sierogruppo-associati nel:											
	Campione A (alto livello di contaminazione)				Campione B (basso livello di contaminazione)				Campione C			
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>wzx<sub>O111</sub></i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>wzx<sub>O111</sub></i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>wzx<sub>O111</sub></i>
<b>Valore atteso</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L186												
L243												
L271												
L320												
L551												
L559												
L656												
L660												
L725												
L733												
L756												
L813												
L832												
L836												
L838												
L885												
L952												

### 5.2. Isolamento del ceppo VTEC O111 dai campioni PCR-positivi

La Tabella 3 riporta i risultati dell'isolamento del ceppo VTEC O111 dalle colture di arricchimento PCR-positive. Nove laboratori (53 %) hanno ottenuto l'isolamento da entrambi i campioni A e B e hanno poi effettuato correttamente la caratterizzazione dei ceppi isolati. Quattro laboratori hanno ottenuto l'isolamento solo dal campione A ad alta carica e infine 4 laboratori (23 %) non sono riusciti a isolare il ceppo VTEC O111 da entrambi i campioni.

**Tabella 3. Isolamento e genotipizzazione dei ceppi VTEC dalle colture di arricchimento PCR-positive.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse il mancato isolamento o i risultati della genotipizzazione sbagliati o mancanti.

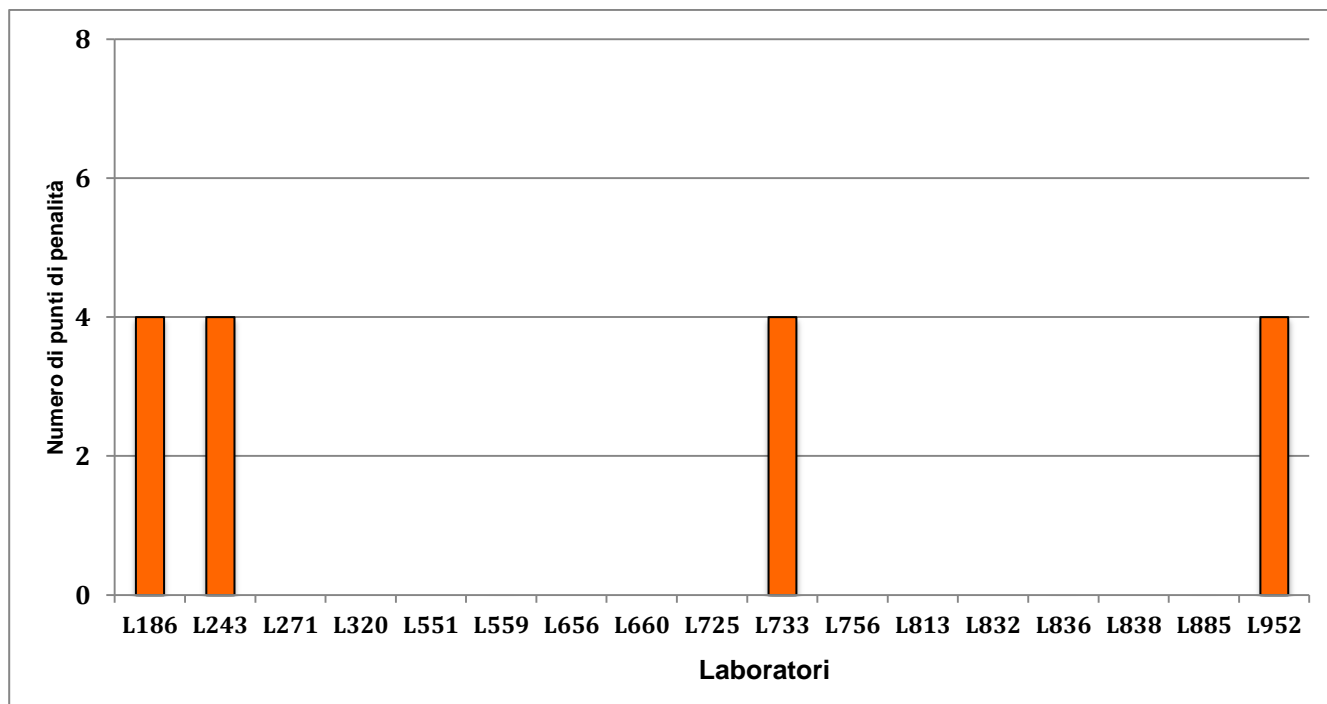
Isolamento e genotipizzazione di ceppi VTEC da:									
Lab	Campione A				Campione A				Campione C
	Isolamento VTEC O111	Genotipo			Isolamento VTEC O111	Genotipo			-
		<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>		<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	
True value	+	+	+	+	+	+	+	+	None
L186									
L243									
L271									
L320									
L551									
L559									
L656									
L660									
L725									
L733									
L756									
L813									
L832									
L836									
L838									
L885									
L952									

### 5.3. Valutazione della performance dei laboratori

La performance analitica dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità, secondo i criteri riportati al paragrafo 4.5.

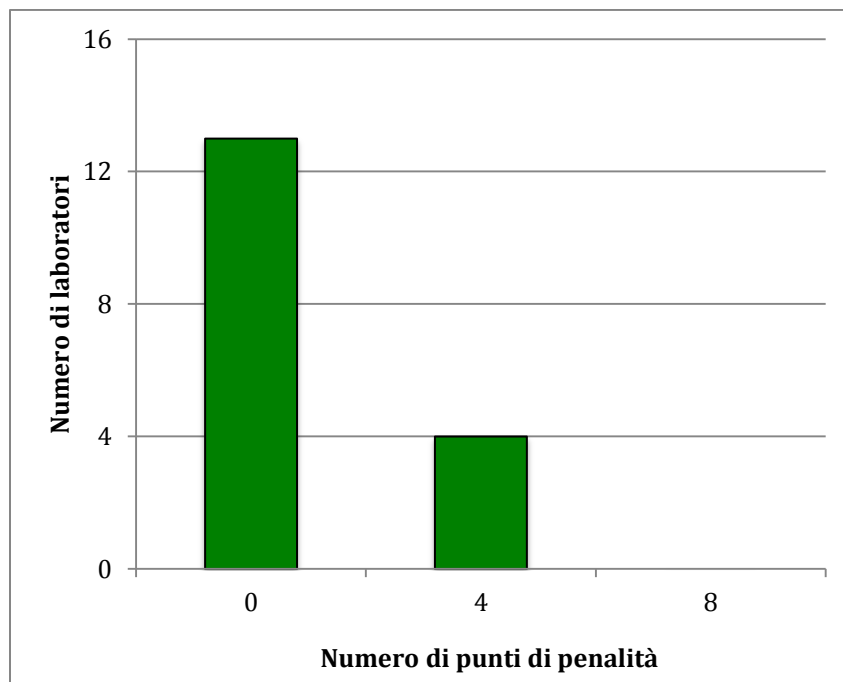
La Figura 1 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti, evidenziando con diversi colori i punti assegnati per i risultati errati o mancanti riportati per fase di screening in Real Time PCR e in quella di isolamento e caratterizzazione dei ceppi VTEC.





**Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. I punti assegnati per risultati errati o mancanti nella fase di screening mediante Real Time PCR sono marcati in rosso, quelli assegnati per la fase di isolamento e caratterizzazione dei ceppi VTEC in giallo. La performance dei laboratori è stata considerata non adeguata per punteggi superiori a 8.

La Figura 2 mostra il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto. Nessun laboratorio ha conseguito un punteggio superiore a 8 e quindi non ci sono stati laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.



**Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori: numero di laboratori per punteggio.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.5. Le barre verdi indicano i laboratori la cui performance è stata considerata adeguata.

## 6. CONSIDERAZIONI

Come per il PT12 e il PT14, la matrice scelta per il PT15 era costituita da germogli destinati al consumo umano diretto. Il Reg. (EU) 209/2013 ha infatti introdotto per i germogli un criterio microbiologico che prevede l'assenza di VTEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 e i laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti devono essere preparati a testare questa matrice secondo quanto prescritto. In accordo col Regolamento 209/2013, il metodo utilizzato nel PT per la ricerca dei VTEC è stato lo standard ISO/TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento predisposto dall'EU-RL VTEC per la rilevare la presenza di VTEC O104:H4.

I campioni sono stati contaminati con un ceppo di VTEC O111, un sierogruppo incluso per la prima volta in un PT sulla ricerca di VTEC negli alimenti, utilizzando due livelli di contaminazione, il più basso dei quali prossimo al limite di rilevabilità stimato per la fase di isolamento del metodo. L'analisi dei risultati ha indotto le seguenti considerazioni:

1. Al PT hanno partecipato 18 laboratori, afferenti a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali e a una ASL e 17 di questi hanno inviato regolarmente i risultati.
2. Nella fase di screening mediante Real Time PCR, tutti i 17 laboratori (100 %) hanno identificato correttamente la presenza di VTEC O111 nei campioni contaminati.
3. Nove laboratori (53 %) hanno ottenuto l'isolamento del ceppo VTEC O111 da entrambi i campioni contaminati, 4 (23 %) solo dal campione con alto livello di contaminazione e 4 (23 %) non sono riusciti ad isolare il ceppo VTEC.
4. Questi risultati confermano che il metodo ISO/TS 13136:2012 è in grado di rilevare efficacemente la contaminazione da VTEC O111 nei germogli, come richiesto dal Reg. (EU) No 209/2013. Tuttavia, dopo la fase di screening molecolare, l'isolamento del ceppo VTEC O111 contaminante non è stato ottenuto in una percentuale rilevante di campioni. Questo risultato riflette la mancanza di terreni selettivi/differenziali per i VTEC non-O157 altrettanto efficaci rispetto a quelli disponibili per *E. coli* O157.
5. Nel complesso, i risultati dello studio indicano che in Italia esiste un numero elevato di laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, distribuiti sulla maggior parte del territorio nazionale, in grado di effettuare correttamente la ricerca dei VTEC nei germogli secondo quanto previsto dal Reg. (EU) No 209/2013.