



**Risultati del 45° test inter-laboratorio nazionale (PT45)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina
(STEC) ed altri *E. coli* diarreagenici - 2025**

Edited by:

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

1. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il PT45, organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli*, aveva come obiettivo la valutazione della competenza dei laboratori ufficiali per quanto concerne:

1. l'identificazione della presenza dei geni di virulenza che caratterizzano i ceppi di *E. coli* patogeni (geni *eae* e *stx* per STEC/EPEC, *ipaH* per EIEC, *sth* e *stp* e *lt* per ETEC, *aggR* e *aaiC* per EAEC, metodi disponibili sul [sito web](#) del Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli*);
2. la determinazione dei 14 sierogruppi STEC indicati nella procedura [EURL-VTEC Method 003 rev2](#);
3. la sottotipizzazione dei geni codificanti le Shiga Tossine (Stx);
4. l'identificazione di cluster di isolati sulla base dell'analisi genomica (obbligatorio per i laboratori che hanno utilizzato il sequenziamento genomico completo, Whole Genome Sequencing WGS, per la caratterizzazione degli isolati).

Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione di questo studio.

2. DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio è stato organizzato in accordo con le prescrizioni generali della norma internazionale ISO/IEC 17043:2010 "Valutazione della conformità – Requisiti generali per le prove valutative".

Il materiale di prova era costituito da sei ceppi di *E. coli* patogeni e lo studio era articolato in quattro moduli analitici obbligatori per tutti i partecipanti:

1. identificare i principali geni di virulenza dei ceppi STEC, *stx1*, *stx2* e il gene *eae*
2. individuare la presenza di geni di virulenza associati ad altri patotipi di *E. coli* diarreagenici, ed in particolare i geni *ipaH* (EIEC), *sth*, *stp* e *lt* (ETEC), *aggR* e *aaiC* (EAEC);
3. determinare il sierogruppo dei ceppi test. Quest'ultimo modulo prevedeva l'identificazione almeno dei seguenti 14 sierogruppi, selezionati in base alla loro importanza epidemiologica o normativa:
 - O26, O103, O111, O145 e O157: i primi cinque sierogruppi STEC, coinvolti in infezioni umane gravi a livello mondiale
 - O45 e O121: sierogruppi epidemiologicamente rilevanti negli USA
 - O104: importante dopo l'epidemia tedesca del 2011

- O55, O80, O91, O113, O128 e O146: selezionati sulla base alla loro prevalenza nelle infezioni umane in Europa negli ultimi anni, secondo i dati raccolti dal Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC);

4. sottotipizzazione dei geni *stx*. Ai partecipanti era richiesto di identificare i sottotipi del gene *stx1* (*stx1a*, *stx1c* e *stx1d*) e del gene *stx2* (da *stx2a* a *stx2g*).

Le determinazioni analitiche potevano essere eseguite utilizzando qualunque metodica in uso nel laboratorio, incluse analisi WGS, o i metodi indicati dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* e pubblicati sul sito web nella sezione “Laboratory Methods” (<https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>).

Ai partecipanti che hanno utilizzato l'analisi WGS per la caratterizzazione degli isolati è stato richiesto di indagare la correlazione tra gli isolati ricevuti per il PT45 sulla base dell'analisi genomica utilizzando software o servizi web di propria scelta, riportando la distanza tra i genomi identificati come parte di un cluster, in termini di intervallo di numero di SNP (*single nucleotide polymorphisms*) o di differenze alleliche rilevate mediante analisi cgMLST (*core genome Multi Locus Sequence Typing*). In aggiunta, i laboratori avevano la possibilità di fornire come risultato un albero filogenetico.

3. PARTICIPANTI

In totale dodici laboratori hanno aderito allo studio. Ciascun laboratorio è stato identificato con un codice numerico univoco, utilizzabile per identificare i laboratori nelle tabelle dei risultati. I laboratori partecipanti sono di seguito elencati:

1. ATS Milano Città Metropolitana - Laboratorio di Prevenzione, Milano
2. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana M. Aleandri, Roma
3. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana, Pisa
4. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Coordinamento di Sicurezza Alimentare, Portici
5. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, UOS Genetica Genomica e Bioinformatica, Portici
6. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotechnologie, Torino
7. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale, Teramo

8. Istituto zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
9. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche Togo Rosati, Fermo
10. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sede Territoriale di Bologna
11. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano (BA)
12. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I sei ceppi di *E. coli* patogeni (identificati con le lettere da A a F nella Tabella 1) sono stati selezionati tra quelli presenti nelle collezioni batteriche del LNR per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, coltivati in purezza e controllati per la presenza di tutte le caratteristiche richieste, riportate nella Tabella 1, prima dell'invio ai laboratori partecipanti.

La Tabella 2 riporta i geni di virulenza accessori identificati tramite sequenziamento dell'intero genoma (WGS) presso il LNR per *E. coli*.

Il 25 Settembre 2025 le serie dei sei ceppi test sono state preparate, partendo da colture stock mantenute in vapori di azoto liquido, rivitalizzati e le loro caratteristiche di riferimento sono state verificate (Tabella 1), quindi sono stati seminati in agar molle (0.3% agar in terreno nutriente) in fiale di vetro borosilicato.

Per quanto concerne la stabilità dei ceppi inoculati in agar molle, i dati disponibili presso il Laboratorio Nazionale ed Europeo di Riferimento per *E. coli* indicano che queste colture sono stabili per oltre due mesi. Le colture sono state incubate per 18 ore a 37 °C ed etichettate con codici alfabetici generati casualmente, diversi per ciascuna serie di ceppi inviati ai laboratori partecipanti.

Il controllo dell'omogeneità è stato eseguito nei giorni 29 e 30 Ottobre 2025 su sei set di ceppi test selezionati casualmente. I restanti campioni di prova sono stati conservati a temperatura ambiente fino al 13 ottobre 2025, quando sono stati spediti ai laboratori partecipanti tramite corriere.

Le caratteristiche dei ceppi forniti sono riportate nelle Tabelle 1 e 2.

Table 1. Caratteristiche dei ceppi di *E. coli* utilizzati nello studio

ID PT45	Sierotipo	MLST	Profilo dei geni di virulenza DEC	Sottotipo <i>stx1</i>	Sottotipo <i>stx2</i>	Cluster
Ceppo 1	O174:H8	13	<i>stx1;stx2</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	Yes
Ceppo 2	O174:H8	13	<i>stx1;stx2</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	Yes
Ceppo 3	O174:H21	677	<i>stx2</i>	-	<i>stx2c</i>	No
Ceppo 4	O174:H8	13	<i>stx2</i>	-	<i>stx2b</i>	No
Ceppo 5	O103:H2	17	<i>stx1;stx2;eae</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	No
Ceppo 6	O113:H4	10	<i>stx2</i>	-	<i>stx2d</i>	No

Tabella 2. Geni di virulenza accessori identificati nei ceppi test tramite analisi WGS

ID PT45	Virulotipo
Ceppo 1	<i>asta, cba, celb, cia, cma, ehxa, espi, gad, iha, irea, iss, iucc, iuta, kpse, kpsmii, lpfa, ompt, senb, suba, terc, tia, trat</i>
Ceppo 2	<i>asta, celb, cia, cma, ehxa, espi, gad, iha, irea, iss, iucc, iuta, kpse, lpfa, senb, suba, terc, tia, trat</i>
Ceppo 3	<i>cea, ehxa, espi, espp, gad, iha, iss, lpfa, papc, saa, suba, terc, tia, trat</i>
Ceppo 4	<i>cba, cea, cia, cma, ehxa, espi, gad, iha, irea, iss, lpfa, ompt, senb, suba, terc, tia, trat</i>
Ceppo 5	<i>cia, cib, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, gad, iha, iss, iucc, nlea, nleb, nlec, ompt, tccp, terc, tir, trat</i>
Ceppo 6	<i>asta, espi, gad, iha, terc, tia</i>

4.2. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I risultati sono stati raccolti utilizzando un sito web dedicato sviluppato dal LNR per *E. coli*. La scadenza per riportare i risultati era il 24 Novembre 2025.

4.3. Valutazione della performance dei laboratori

La competenza dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni determinazione errata nella caratterizzazione dei ceppi STEC in accordo con il seguente schema:

- **4 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione della presenza dei geni *stx1* e *stx2*.
- **2 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione dei geni *eae*, *ipaH*, *aggR*, *aaiC*, *lt*, *sth* e *stp*.

- **2 punti** per errori nella determinazione dei 14 sierogruppi indicati nel paragrafo 4.2.
- **1 punto** per ogni risultato riguardante l'identificazione dei sierogruppi, riportato come “Not Done” o “Null”. Non sono state assegnate penalità a quei laboratori che hanno riportato ONT per la determinazione del sierogruppo O174 per i ceppi 1-4, in quanto questo sierogruppo cadeva al di fuori del campo di applicazione del metodo EURL-VTEC Method 003 rev2.
- **2 punti** per ogni risultato errato o mancante per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*, calcolando separatamente i risultati per i geni *stx1* ed *stx2*.

La somma dei punti di penalità ottenuti è stata usata per valutare la competenza dei laboratori, considerando una soglia di **otto punti** di penalità per definire una competenza non soddisfacente.

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, 2 punti di penalità sono stati assegnati per ogni errore nell'assegnazione di un ceppo al cluster, considerando una soglia di **due punti** di penalità per definire una competenza non soddisfacente.

5. RISULTATI

Tutti i 12 laboratori che hanno aderito al PT45 hanno riportato i risultati. La Figura 1 mostra la proporzione dei laboratori partecipanti in relazione ai metodi utilizzati per caratterizzare gli isolati.

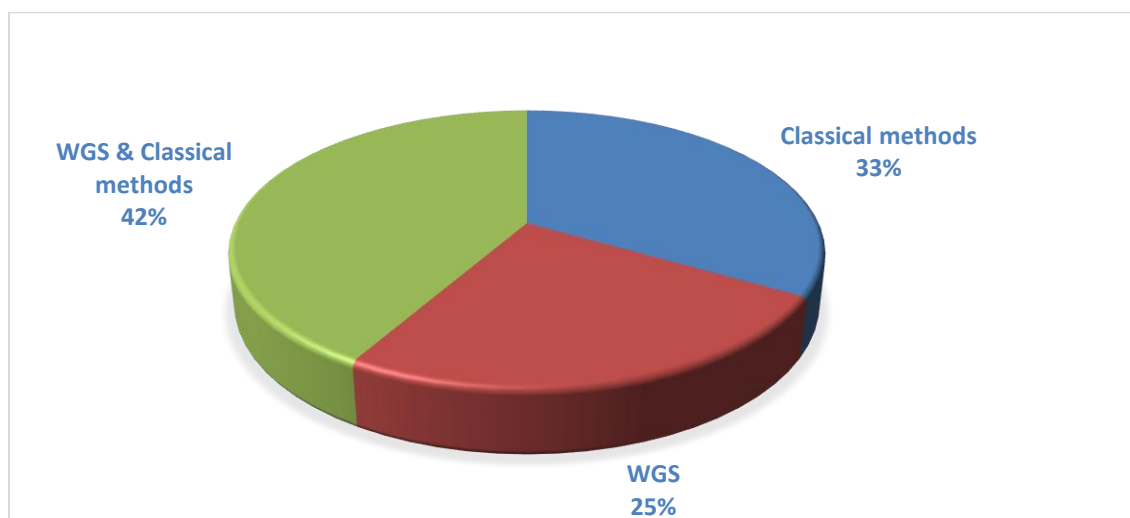


Figure 1. Laboratori partecipanti suddivisi per tipologia di metodo analitico

5.1. Caratterizzazione dei ceppi test

I risultati aggregati relativi alla caratterizzazione dei ceppi riportati da ciascun laboratorio sono mostrati nelle tabelle seguenti (Tabelle 3a - 3f). I risultati non corretti, che hanno portato all'assegnazione di punti di penalità, sono evidenziati in rosso.

Tabella 3a. Caratterizzazione del ceppo test 1

Ceppo 1	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Sottotipo <i>stx</i>	Penalità assegnate a ciascun laboratorio	WGS	Metodi classici	WGS & Metodi classici
Risultato atteso	<i>stx1;stx2</i>	O174:H8	<i>stx1c;stx2b</i>				
Numero di laboratori	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato				
4	<i>stx1;stx2</i>	ND	<i>stx1c;stx2b</i>	0 ¹	0	4	0
8	<i>stx1;stx2</i>	O174:H8	<i>stx1c;stx2b</i>	0	3	0	5

¹ Non sono stati attribuiti punti di penalità alla mancata identificazione del sierogruppo O174, in quanto questo sierogruppo cadeva al di fuori del campo di applicazione del metodo EURL-VTEC Method 003 rev2.

Tabella 3b. Caratterizzazione del ceppo test 2

Ceppo 2	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Sottotipo <i>stx</i>	Penalità assegnate a ciascun laboratorio	WGS	Metodi classici	WGS & Metodi classici
Risultato atteso	<i>stx1;stx2</i>	O174:H8	<i>stx1c;stx2b</i>				
Numero di laboratori	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato				
4	<i>stx1;stx2</i>	ND	<i>stx1c;stx2b</i>	0 ¹	0	4	0
8	<i>stx1;stx2</i>	O174:H8	<i>stx1c;stx2b</i>	0	3	0	5

¹ Non sono stati attribuiti punti di penalità alla mancata identificazione del sierogruppo O174, in quanto questo sierogruppo cadeva al di fuori del campo di applicazione del metodo EURL-VTEC Method 003 rev2.

Tabella 3c. Caratterizzazione del ceppo test 3

Ceppo 3	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Sottotipo <i>stx</i>	Penalità assegnate a ciascun laboratorio	WGS	Metodi classici	WGS & Metodi classici
Risultato atteso	<i>stx2</i>	O174:H21	<i>stx2c</i>				
Numero di laboratori	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato				
2	<i>stx2</i>	ND	<i>stx2a;stx2c;stx2d</i>	2 ¹	0	1	1
3	<i>stx2</i>	ND	<i>stx2c</i>	0 ¹	0	3	0
7	<i>stx2</i>	O174:H21	<i>stx2c</i>	0	3	0	4

¹ Non sono stati attribuiti punti di penalità alla mancata identificazione del sierogruppo O174, in quanto questo sierogruppo cadeva al di fuori del campo di applicazione del metodo EURL-VTEC Method 003 rev2.

Tabella 3d. Caratterizzazione del ceppo test 4

Ceppo 4	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Sottotipo <i>stx</i>	Penalità assegnate a ciascun laboratorio	WGS	Metodi classici	WGS & Metodi classici
Risultato atteso	<i>stx2</i>	O174:H8	<i>stx2b</i>				
Numero di laboratori	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato				
5	<i>stx2</i>	ND	<i>stx2b</i>	0 ¹	0	4	1
1	<i>stx2</i>	O?:H8	<i>stx2b</i>	0 ¹	1	0	0
6	<i>stx2</i>	O174:H8	<i>stx2b</i>	0	2	0	4

¹ Non sono stati attribuiti punti di penalità alla mancata identificazione del sierogruppo O174, in quanto questo sierogruppo cadeva al di fuori del campo di applicazione del metodo EURL-VTEC Method 003 rev2.

Tabella 3e. Caratterizzazione del ceppo test 5

Ceppo 5	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Sottotipo <i>stx</i>	Penalità assegnate a ciascun laboratorio	WGS	Metodi classici	WGS & Metodi classici
Risultato atteso	<i>stx1;stx2;eae</i>	O103:H2	<i>stx1a;stx2a</i>				
Numero di laboratori	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato				
4	<i>stx1;stx2;eae</i>	O103	<i>stx1a;stx2a</i>	0	0	4	0
8	<i>stx1;stx2;eae</i>	O103:H2	<i>stx1a;stx2a</i>	0	3	0	5

Tabella 3f. Caratterizzazione del ceppo test 6

Ceppo 6	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Sottotipo <i>stx</i>	Penalità assegnate a ciascun laboratorio	WGS	Metodi classici	WGS & Metodi classici
Risultato atteso	<i>stx2</i>	O113:H4	<i>stx2d</i>				
Numero di laboratori	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato				
4	<i>stx2</i>	O113	<i>stx2d</i>	0	0	3	1
1	<i>stx2</i>	O113:H4	<i>stx2c</i>	2	0	1	0
7	<i>stx2</i>	O113:H4	<i>stx2d</i>	0	3	0	4

5.2 Analisi filogenetica

I risultati relativi all'analisi filogenetica sono stati inviati dagli otto laboratori che hanno utilizzato il WGS come metodo analitico per la caratterizzazione degli isolati. La Figura 2 mostra i metodi utilizzati per questo esercizio, con la proporzione di laboratori che hanno applicato ciascun metodo.

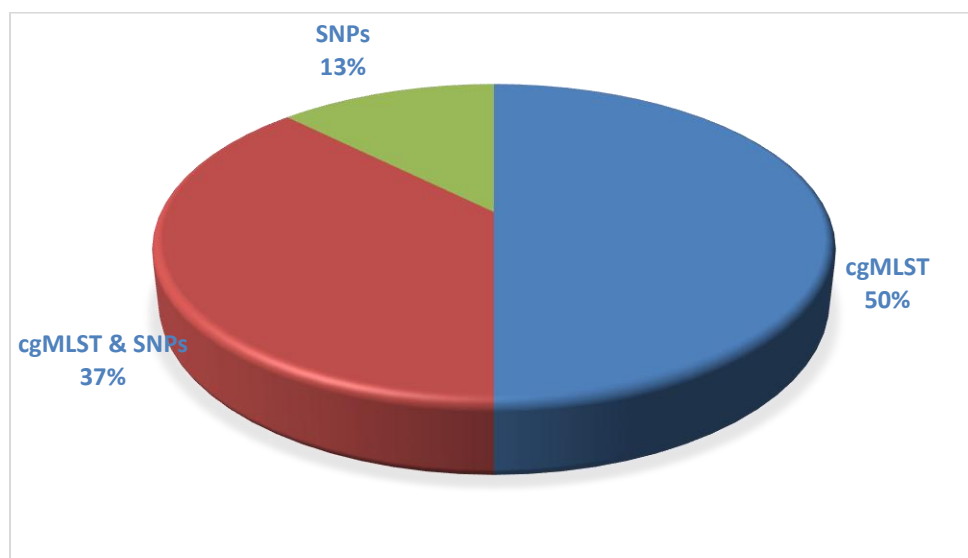


Figure 2. Metodi utilizzati dagli otto laboratori che hanno eseguito l'analisi filogenetica

I risultati dell'analisi filogenetica sono riportati nella Tabella 4. Tutti i partecipanti hanno correttamente identificato il cluster composto dai ceppi test 1 e 2.

Tabella 4. Risultati dell'analisi filogenetica

	Ceppo 1	Ceppo 2	Ceppo 3	Ceppo 4	Ceppo 5	Ceppo 6		
Risultato atteso	Yes	Yes	No	No	No	No		
Numero di laboratori	Risultati riportati						Distanza	Metodo
3	Yes	Yes	No	No	No	No	0-5 AD	cgMLST
1	Yes	Yes	No	No	No	No	0-10 AD	cgMLST
1	Yes	Yes	No	No	No	No	0-1 AD; 0-2 SNPs	cgMLST & SNPs
1	Yes	Yes	No	No	No	No	0-5	cgMLST & SNPs
1	Yes	Yes	No	No	No	No	0-6 AD; 0-9 SNPs	cgMLST & SNPs
1	Yes	Yes	No	No	No	No	0-1 SNPs	SNPs

AD: Differenze alleliche, SNPs: Differenze in SNP.

6. VALUTAZIONE DELLA COMPETENZA DEI LABORATORI PARTECIPANTI

La competenza dei laboratori partecipanti è stata valutata come descritto nel paragrafo 4.3. I risultati sono riportati nella **Figura 3**. Tutti i laboratori hanno mostrato una performance soddisfacente. Nessuno dei laboratori ha ricevuto penalità per l'esercizio di analisi filogenetica.

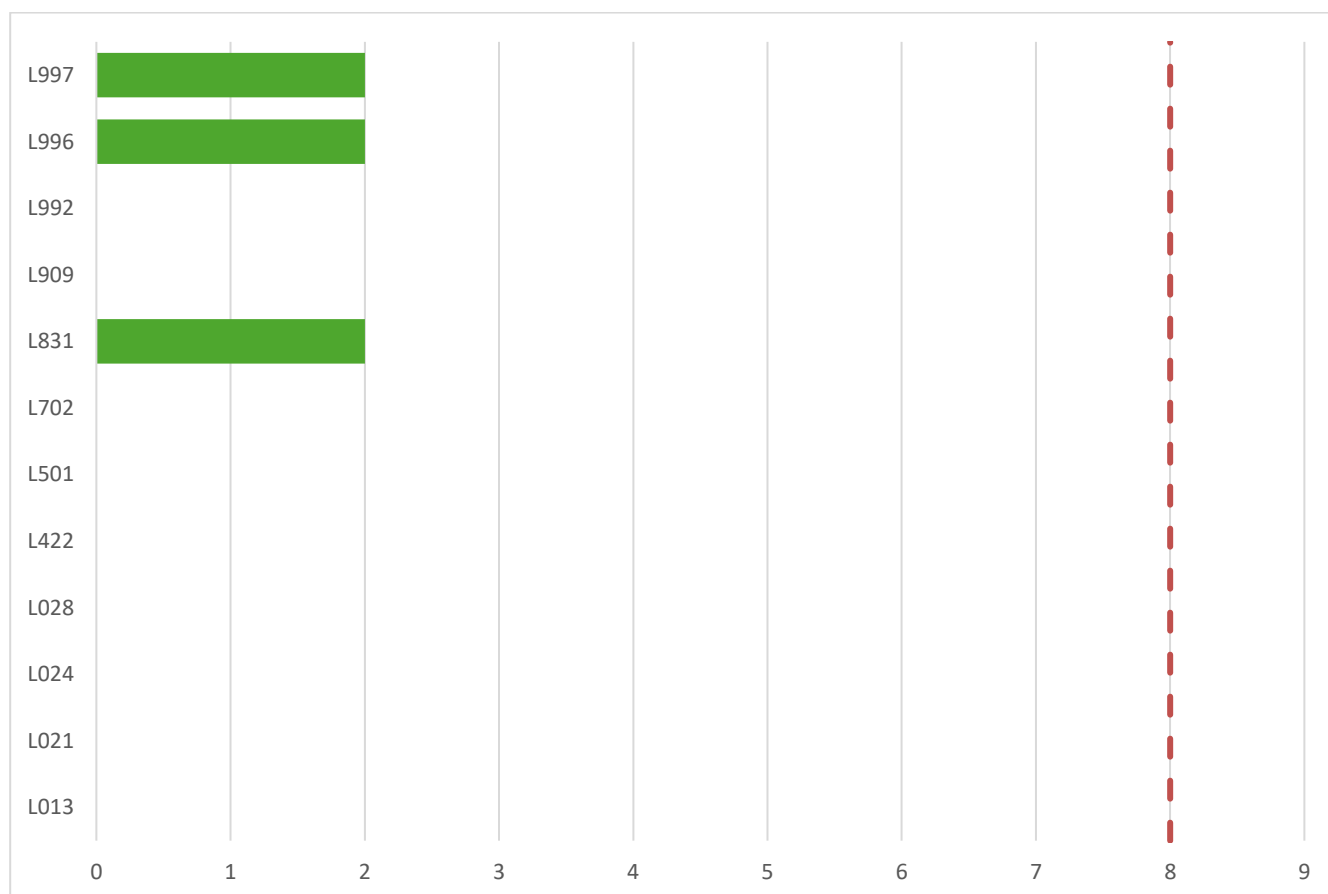


Figura 3. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante

7. CONSIDERAZIONI FINALI

1. Dodici laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito allo studio.
2. Tutti i laboratori hanno mostrato un'ottima competenza relativamente all'identificazione dei geni di virulenza dei ceppi STEC e alla determinazione del sierogruppo dei ceppi inviati.
3. L'analisi di sequenze WGS è stata applicata dal 67% dei laboratori (N=8), percentuale in crescita rispetto allo scorso anno (44%), che hanno mostrato una competenza eccellente sia nella caratterizzazione degli isolati che nell'analisi filogenetica.
4. Tre laboratori hanno commesso errori nell'identificazione del sottotipo dei geni *stx*, due dei quali avevano utilizzato solamente metodi classici. Si sottolinea che una procedura per la sottotipizzazione dei geni *stx* è disponibile sul sito web del Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* ([EURL-VTEC Method 006 Rev 2](#)) e che il LNR organizza ogni anno corsi di formazione in presenza che includono l'applicazione di questa metodica, ai quali i laboratori possono chiedere di partecipare.