



**Risultati del 10° test inter-laboratorio (PT10) per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) – 2012-2013**

**A cura di:**

*Susan Babsa, Alfredo Caprioli, Clarissa Ferreri, Fabio Galati, Maria Luisa Marziano, Antonella Maugliani, Fabio Minelli, Stefano Morabito, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli*

Nel 2010, il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato un test inter-laboratorio per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) che prevedeva anche la determinazione delle principali varianti dei geni *vtx* finora classificate (PT6).

Lo studio era stato organizzato insieme al *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Escherichia and Klebsiella*, operante presso lo *Statens Serum Institute*, a Copenhagen (SSI), che coordina la rete dei Laboratori Nazionali di Riferimento degli Stati Membri UE per le infezioni umane, che afferisce al *Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Surveillance Programme* dello *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC).

Nel 2012, il 10° test inter-laboratorio per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è stato nuovamente organizzato insieme al *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Escherichia and Klebsiella*, operante presso lo SSI, e ha riguardato l'identificazione e la tipizzazione di un set di ceppi di *E. coli* come VTEC mediante l'amplificazione PCR dei loro geni di virulenza e la determinazione del sierogruppo, seguita dalla tipizzazione delle varianti dei loro geni *vtx* utilizzando una revisione del protocollo sperimentale di PCR utilizzato nell'ambito del PT6. Lo studio ha anche incluso per la prima volta l'identificazione dei geni caratteristici dei ceppi di *E. coli* enteroaggregativi (EAaggEC), *aggR* e *aaiC*, e la tipizzazione molecolare dei ceppi mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Quest'ultima parte è stata introdotta per preparare i laboratori a fare fronte alle richieste di ECDC ed EFSA di integrare i dati microbiologici sui ceppi di origine umana e non-umana con i relativi profili molecolari di PFGE.

In questo rapporto sono presentati e valutati i risultati riguardanti la ricerca e la tipizzazione dei geni virulenza e quelli della tipizzazione sierologica. I risultati della tipizzazione molecolare mediante PFGE saranno presentati in un rapporto separato.

Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferimento (EU-RL) per questo patogeno, 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 34 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/binary/vtec/cont/PT10\\_Report.pdf](http://www.iss.it/binary/vtec/cont/PT10_Report.pdf)).

## 1. PARTECIPANTI

Al test hanno partecipato 10 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti a 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS della Puglia e della Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZS della Lombardia e della Emilia Romagna, Reparto di Microbiologia, Laboratorio Microbiologia, Brescia
- IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Bologna
- IZS delle Regioni Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Roma
- IZS della Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- IZS dell'Umbria e delle Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici PGCB, Perugia
- IZS delle Venezie, Sezione Pordenone e Udine, Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, OIE/National Reference Laboratory for Salmonellosis, Legnaro (PD)

## 2. OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

Lo studio aveva i seguenti obiettivi:

1. L'identificazione dei ceppi VTEC mediante la ricerca dei loro principali geni di virulenza: *vtx1 group*, *vtx2 group* ed *eae*.
2. La ricerca dei geni di virulenza che rappresentano il *target* diagnostico per gli *E. coli* entero-aggregativi (EAggEC), un altro gruppo di *E. coli* patogeni la cui importanza è molto cresciuta dopo il focolaio epidemico europeo del 2011 causato da un ceppo "mosaico" originato dall'acquisizione di un batteriofago portatore del gene *vtx2* da parte di un ceppo EAggEC O104:H4.
3. La tipizzazione sierologica dei ceppi VTEC, identificando i ceppi appartenenti ai 12 sierogruppi più frequentemente coinvolti nelle infezioni umane, ovvero l'identificazione dei sierogruppi mediante amplificazione PCR dei geni associati con gli antigeni O dei sierogruppi (sierotipizzazione molecolare).
4. La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx1* e *vtx2*, utilizzando una revisione del protocollo sperimentale di PCR utilizzato nell'ambito del PT6.
5. Una prima esperienza di valutazione esterna di qualità sulla tipizzazione molecolare dei ceppi mediante PFGE. I risultati di quest'ultima sezione dello studio non fanno parte di questo report.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Preparazione dei campioni

Il campione oggetto di analisi era costituito da 15 ceppi di *E. coli*, le cui caratteristiche sono riportate nella Tabella 1 e sono state considerate come “valori reali” (*gold standard*).

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

Ceppo	Sierograppo	<i>vtx1</i> group gene (subtype)	<i>vtx2</i> group gene (subtype)	gene <i>eae</i>	gene <i>aggR</i>	gene <i>aaic</i>
1	O113	+ ( <i>vtx1c</i> )	+ ( <i>vtx2b</i> )	-	-	-
2	O177	-	-	+	-	-
3	O121	-	+ ( <i>vtx2a</i> )	+	-	-
4	O128	+ ( <i>vtx1c</i> )	-	-	-	-
5	O41	+ ( <i>vtx1d</i> )	-	-	-	-
6	O26	-	+ ( <i>vtx2a</i> )	+	-	-
7	O111	+ ( <i>vtx1a</i> )	-	+	-	-
8	O104	-	-	-	+	+
9	O157	-	+ ( <i>vtx2a, vtx2c</i> )	+	-	-
10	O146	-	+ ( <i>vtx2d</i> )	-	-	-
11	O103	+ ( <i>vtx1a</i> )	-	+	-	-
12	O157	-	+ ( <i>vtx2a</i> )	+	-	-
13	O166	-	+ ( <i>vtx2d</i> )	-	-	-
14	O78	-	-	-	-	-
15	O124	-	-	-	-	-

I campioni (colture batteriche seminate per infissione in agar molle) sono stati preparati all'SSI, Copenhagen, nel periodo 22 - 26 Novembre 2012, con la collaborazione di un ricercatore dell'EU-RL VTEC. I campioni, identificati con codici numerici a tre cifre assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio, sono stati inviati tra il 27 Novembre e il 4 Dicembre 2012. La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state verificate secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010.

### **3.2. Metodi di laboratorio**

I metodi PCR per la ricerca dei geni di virulenza dei VTEC e degli EAggEC, per la ricerca dei geni associati ai sierogruppi (sierotipizzazione molecolare) e per la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* sono stati forniti ai laboratori partecipanti.

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

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando pagine dedicate accessibili attraverso la *Restricted Area* della sezione *Proficiency Tests* del sito web dell'EU-RL VTEC ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)), previa presentazione di *User ID* e *password*, inviate ad 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.

### **3.4. Analisi dei risultati**

La performance analitica dei laboratori è stata valutata per la ricerca dei geni di virulenza e per la sierotipizzazione (determinazione del sierogruppo O).

#### **3.4.1. Valutazione della performance dei laboratori nella identificazione dei geni di virulenza**

La performance analitica dei laboratori nella ricerca dei geni di virulenza dei VTEC (*vtx1 gene group*, *vtx2 gene group*, ed *eae*), e degli EAggEC (*aggR*, e *aaiC*) è stata valutata assegnando punti di penalità per i geni identificati in maniera errata. I punti di penalità sono stati assegnati con i seguenti criteri, basati sulla rilevanza di sanità pubblica:

- **4 punti** ad ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione dei geni *vtx*, che rappresentano il target principale del metodo ISO/TS 13136:2012, lo standard internazionale per la ricerca dei VTEC negli alimenti, oggetto dei precedenti PT.
- **2 punti** ad ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione degli altri geni di virulenza presi in considerazione nel PT10 (*eae*, *AggR*, *aaiC*).
- **1 punto** ad ogni risultato riportato come "Non Eseguito".

La somma dei punti di penalità ha generato un punteggio usato per valutare la performance di ogni laboratorio. In particolare, una soglia di 4 punti è stata fissata per

definire una performance non adeguata, con l'eccezione dei laboratori che hanno totalizzato 4 punti senza commettere errori riguardanti l'identificazione dei geni *vtx*.

### **3.4.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O**

La performance analitica è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni ceppo tipizzato in modo errato. I punti sono stati assegnati con i seguenti criteri, in base alla rilevanza di sanità pubblica del sierogruppo in questione, valutata sulla base dei dati sulle infezioni umane in Europa pubblicati periodicamente dall'ECDC:

- **4 punti:** per errori nella tipizzazione di ceppi che appartenevano ai 5 sierogruppi, “*top 5*”, maggiormente associati a sindrome emolitico uremica (SEU) in Europa: O26, O103, O111, O145, O157.
- **2 punti:** per errori nella tipizzazione di ceppi che appartenevano agli altri 7 sierogruppi associati a infezioni umane e inclusi nello scopo di questo studio: O55, O91, O104, O113, O121, O128, O146.
- **1 punto:** per errori nella tipizzazione dei ceppi 2, 5, 13, 14, e 15, che non appartenevano a sierogruppi comunemente associati a infezioni umane in Europa. Per questi ceppi, un risultato di “non tipizzabile” (ONT) è stato considerato come corretto.

La somma dei punti di penalità ha generato un punteggio usato per valutare la performance. In particolare, una soglia di 4 punti è stata fissata per definire una performance non adeguata, con l'eccezione dei laboratori che hanno totalizzato 4 punti senza commettere errori riguardanti i ceppi appartenenti ai sierogruppi “*top 5*”.

### **3.4.3. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx***

La performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx* è stata valutata assegnando punti di penalità per i geni identificati in maniera errata. I punti di penalità sono stati assegnati con i seguenti criteri:

- **2 punti** ad ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione dei geni *vtx2a* e *vtx2c*, che sono quelle maggiormente associate ai ceppi che causano SEU.
- **1 punto** a ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione delle altre varianti geniche e a ogni risultato riportato come “Non Eseguito”.

La somma dei punti di penalità ha generato un punteggio usato per valutare la performance di ogni laboratorio. In particolare, una soglia di 4 punti è stata fissata per definire una performance non adeguata, con l'eccezione dei laboratori che hanno

totalizzato 4 punti senza commettere errori riguardanti i geni *vtx2a* e *vtx2c*.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Identificazione dei geni di virulenza

I risultati della ricerca dei geni di virulenza sono riportati nella Tabella 2 (1-5).

La Tabella 3 riassume i risultati ottenuti sui 15 ceppi test.

**Tabella 2 (1). Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:														
	Ceppo 1					Ceppo 2					Ceppo 3				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
Valore atteso	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
L16															
L28															
L51			+												
L55															
L57															
L75											+			+	+
L78										+					
L88															
L99								-							
L116															

**Tabella 2 (2). Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

LAB	Identificazione dei geni di virulenza nel:														
	Ceppo 4					Ceppo 5					Ceppo 6				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
Valore atteso	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
L16															
L28															
L51			+					+							
L55	-														
L57															
L75								+	+	+					
L78					+										+
L88															
L99															
L116		+	+												

**Tabella 2 (3). Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

NRL	Identificazione dei geni di virulenza nel:														
	Ceppo 7					Ceppo 8					Ceppo 9				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
Valore atteso	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
L16															
L28															
L51								+							
L55															
L57							+								
L75				+	+						+			+	+
L78					+										+
L88															
L99															
L116									-	-					



**Tabella 2 (4). Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

LAB	Identificazione dei geni di virulenza nel:														
	Ceppo 10					Ceppo 11					Ceppo 12				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
Valore atteso	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
L16															
L28															
L51			+												
L55															
L57															
L75	+										+	-		+	+
L78					+										+
L88															
L99															
L116															

**Tabella 2 (5). Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

LAB	Identificazione dei geni di virulenza nel:														
	Ceppo 13					Ceppo 14					Ceppo 15				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
Valore atteso	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L16															
L28						+	+								
L51			+										+		
L55															
L57															
L75	+														
L78										+					
L88															
L99															
L116															

**Tabella 3. Risultati complessivi dell'Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi indicano che per il dato ceppo sono stati ottenuti risultati corretti per tutti i geni ricercati. Le caselle rosse indicano che per un dato ceppo sono stati riportati risultati errati. I numeri nella casella indicano il numero di errori per ogni ceppo.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel ceppo:														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
L16															
L28														2	
L51	1			1	1			1		1			1		1
L55				1											
L57								1							
L75			3		2	1	2		3	1		4	1		
L78		1		1		1	1		1	1		1		1	
L88															
L99		1													
L116				2				2							

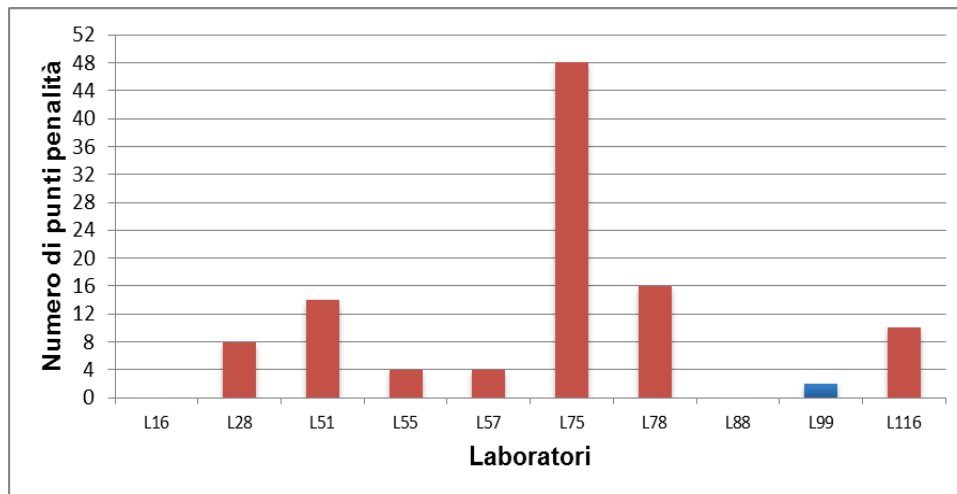
Solo 2 dei 10 Laboratori hanno identificato correttamente la presenza/assenza di tutti i geni target in tutti i ceppi test. Gli altri 8 Laboratori hanno prodotto un totale di 41 risultati errati (36 falsi positivi e 5 falsi negativi).

**Tabella 4. Risultati complessivi dell'Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi indicano che per il dato gene sono stati ottenuti risultati corretti per tutti i 15 ceppi test. Le caselle rosse indicano che per un dato gene sono stati riportati risultati errati. I numeri nella casella indicano il numero degli errori

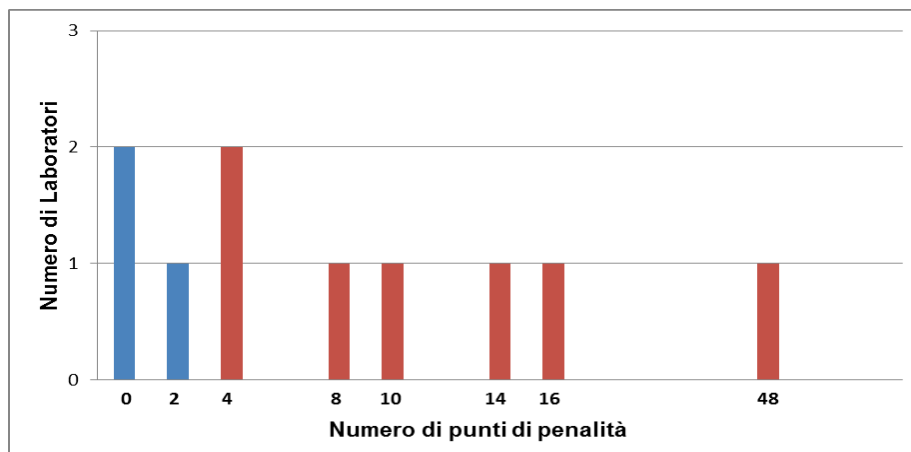
Lab	Identificazione dei geni di virulenza nei 15 ceppi test				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
L16					
L28	1	1			
L51			7		
L55	1				
L57		1			
L75	6	1		5	5
L78					8
L88					
L99			1		
L116		1	1	1	1

La Tabella 4 riassume i risultati dei saggi PCR per ogni gene di virulenza. Tre Laboratori hanno prodotto 8 risultati errati per il gene *vtx1* (7 falsi positivi e 1 falso negativo), 4 Laboratori 4 risultati errati per il gene *vtx2* (3 falsi positivi e 1 falso negativo), 3 Laboratori 9 risultati errati per il gene *eae* (8 falsi positivi e 1 falso negativo), 2 Laboratori 6 risultati errati per il gene *aggR* (5 falsi positivi e 1 falso negativo), 3 Laboratori 14 risultati errati per il gene *aaic* (13 falsi positivi e 1 falso negativo). In particolare, 1 laboratorio (L116) non ha identificato il ceppo EAggEC incluso nello studio (campione 8), producendo risultati falsi negativi per entrambi i geni target.

La performance analitica dei laboratori nella ricerca dei geni di virulenza è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 3.4.1. La Figura 1 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti e la Figura 2 il numero dei laboratori secondo il punteggio. Tre Laboratori hanno conseguito un punteggio inferiore a 4 mentre per gli altri 7 la performance non è stata considerata adeguata.



**Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori nella identificazione dei geni di virulenza.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.4.1. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.



**Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori nella identificazione dei geni di virulenza: numero di laboratori per punteggio.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.4.1. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

#### 4.2. Identificazione del sierogruppo O

La Tabella 5 riporta i risultati relativi all'Identificazione del sierogruppo. Il risultato "non tipizzabile" (ONT) è stato considerato corretto per i 5 ceppi che appartenevano a sierogruppi non associati comunemente alle infezioni umane da VTEC in Europa e che pertanto non rientravano nello scopo di questo studio (ceppi 2, 5, 13, 14, e 15).

Sei Laboratori hanno identificato correttamente il sierogruppo dei 15 ceppi test. Gli altri 4 laboratori hanno prodotto un totale di 21 risultati errati. Il numero di risultati errati per laboratorio andava da 1 a 14. Tutti i Laboratori tranne uno (L57) hanno identificato correttamente i ceppi che appartenevano ai 5 sierogruppi, "top 5", maggiormente associati a SEU in Europa (O26, O103, O111, O145, O157) e il ceppo O104.

**Tabella 5. Identificazione del sierogruppo.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna. Le caselle rosse evidenziano i risultati errati, con il risultato riportato dal Laboratorio. ONT = non tipizzabile.

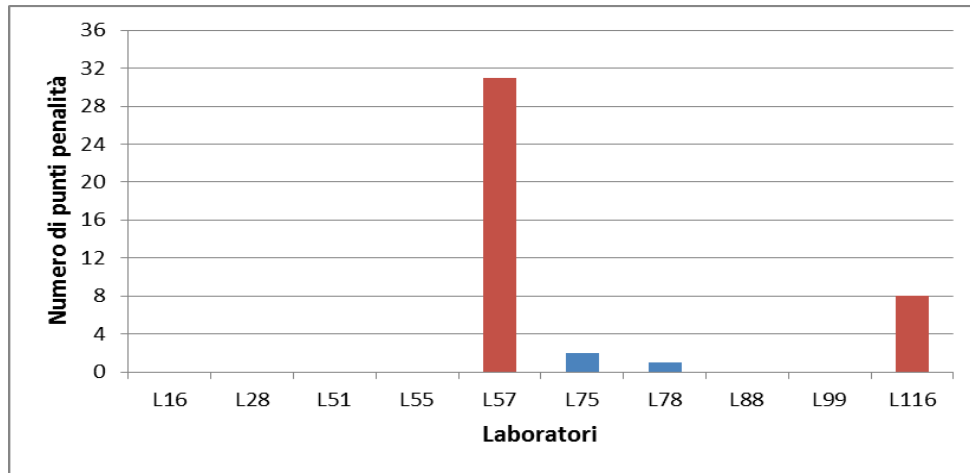
Lab	Identificazione del sierogruppo nel ceppo:														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Valore atteso</b>	O113	O177 (ONT)	O121	O128	O41 (ONT)	O26	O111	O104	O157	O146	O103	O157	O166 (ONT)	O78 (ONT)	O124 (ONT)
L16		ONT			ONT								ONT	ONT	ONT
L28		ONT			ONT								ONT	ONT	ONT
L51		ONT			ONT								ONT	ONT	ONT
L55		ONT			ONT								ONT	ONT	ONT
L57	O157 O145	O157 O26 O146	O111 O145	O157 O145	O157 O26 O145	O26 O145	O111 O145	O104 O145	O157 O145	O145	O157		O157 O26 O111 O145	O157 O26 O145	O145
L75		O146			O121								ONT	ONT	ONT
L78		ONT			ONT								O111	ONT	ONT
L88		ONT			ONT								ONT	ONT	ONT
L99		ONT			ONT								ONT	ONT	ONT
L116	ONT	ONT	ONT	ONT	ONT					ONT			ONT	ONT	ONT

A ogni Laboratorio sono stati assegnati punti di penalità utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.3.2.

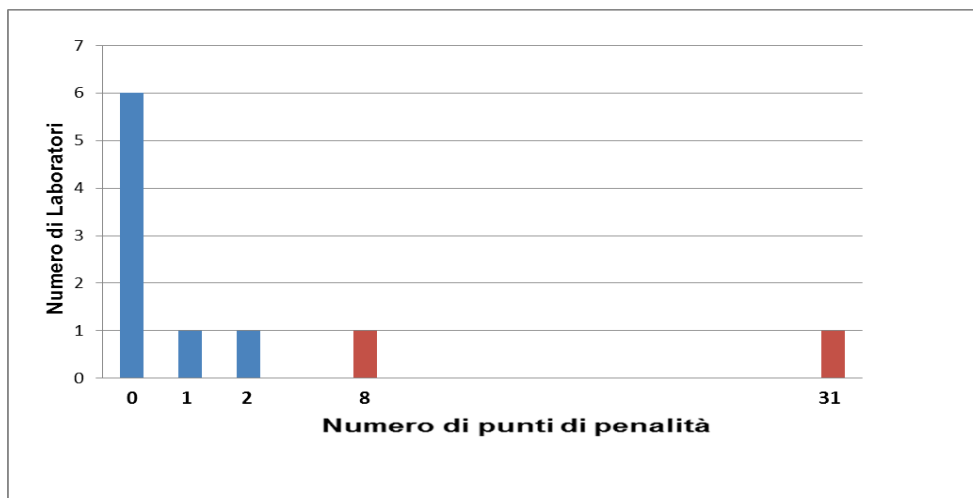
La Figura 1 mostra il punteggio ottenuto da ciascun Laboratorio.

Nella Figura 2 i Laboratori sono raggruppati in base al punteggio conseguito.

Due Laboratori hanno conseguito un punteggio maggiore di 4 e la loro performance è stata quindi considerata non adeguata.



**Figura 1. Valutazione dei risultati di sierotipizzazione dei Laboratori.** Il numero di punti di penalità è stato calcolato utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.3.2. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.



**Figura 2. Valutazione dei risultati di sierotipizzazione: numero di laboratori per punteggio conseguito.** Il numero di punti di penalità è stato calcolato utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.3.2. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

### 4.3. Identificazione delle varianti dei geni *vtx*

La tipizzazione delle varianti dei geni *i* è stata effettuata da 3 Laboratori. I risultati dei test PCR per l'identificazione delle varianti dei geni *vtx1* e *vtx2* sono riportati nella Tabella 6 e nella Tabella 7 (1-2), rispettivamente.

Nell'insieme, 2 laboratori hanno riportato un totale di 3 errori: un falso negativo per la variante *vtx1c* e 2 falsi positivi per variante *vtx2c*.

**Tabella 6. Identificazione delle varianti del gene *vtx1* mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione della variante genica nel:														
	Campione 1			Campione 4			Campione 5			Campione 7			Campione 11		
	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>
Valore atteso	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
L16															
L55					-										
L88															

**Tabella 7 (1). Identificazione delle varianti del gene *vtx2* mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione della variante genica nel:															
	Campione 1				Campione 3				Campione 6				Campione 9			
	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>
Valore atteso	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
L16																
L55																
L88																

**Tabella 7 (2). Identificazione delle varianti del gene *vtx2* mediante PCR.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione della variante genica nel:											
	Campione 10				Campione 12				Campione 13			
	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>
Valore atteso	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
L16												+
L55												+
L88												

Assegnando i punti di penalità con i criteri descritti nel paragrafo 4.3.3, il Laboratorio L88 ha riportato 0 punti, il Laboratorio L16 2 punti e il Laboratorio L55 3 punti. La performance Di questi Laboratori è stata quindi considerata adeguata.

## 5. CONSIDERAZIONI

- Allo studio hanno partecipato 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali, con un totale di 10 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.
- Per quanto riguarda l'identificazione dei geni di virulenza dei VTEC, la performance analitica è risultata adeguata per tre laboratori, mentre alcuni hanno trovato difficoltà nell'identificazione dei geni associati all'adesione entero-aggregativa, inseriti per la prima volta nel programma di PT.
- Per quanto riguarda l'identificazione dei sierogruppi più importanti per le infezioni umane, la performance analitica è risultata non adeguata per 2 laboratori.
- Solo 3 laboratori hanno effettuato l'identificazione delle varianti dei geni *vtx*, che può essere considerato una tipizzazione di secondo livello dei ceppi VTEC. Per questi laboratori la performance analitica è risultata adeguata e i loro risultati sono stati in linea con quelli prodotti dagli NRL europei (report a [http://www.iss.it/binary/vtec/cont/PT10\\_Report.pdf](http://www.iss.it/binary/vtec/cont/PT10_Report.pdf)). Nell'insieme, questi risultati hanno indicato che la revisione del protocollo sperimentale di PCR utilizzato nell'ambito del PT6 ha prodotto un sostanziale miglioramento della performance della metodica, soprattutto per quanto riguarda la specificità del metodo per le varianti del gene *vtx2*.