

Risultati del 2° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) - 2008

Il 2° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è stato organizzato nel 2008 dal Laboratorio Nazionale di Riferenza (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità. Poiché il Laboratorio è anche Laboratorio Comunitario di Riferenza (CRL) per questo patogeno, il ring test nazionale è stato condotto contestualmente al ring test europeo. Quest'ultimo ha visto la partecipazione di 28 LNR di 22 Stati Membri dell'Unione Europea e la Norvegia, attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare.

1- PARTECIPANTI

Al ring test nazionale hanno partecipato 10 laboratori di 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sede di Torino
- IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, sede di Brescia
- IZS delle Venezie, sezione di Cordenons (Pn)
- IZS dell'Umbria e delle Marche, sede di Perugia
- IZS del Lazio e Toscana, sede di Roma (2 laboratori)
- IZS dell'Abruzzo e del Molise, sede di Teramo
- IZS del Mezzogiorno, sede centrale di Portici
- IZS della Puglia e Basilicata, sede di Foggia
- IZS della Sicilia, sede di Palermo

2- OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

Considerati i risultati soddisfacenti del primo test sull'identificazione dei VTEC condotto nel 2007, il secondo test ha avuto l'obiettivo di armonizzare i metodi PCR utilizzati per rivelare la presenza dei principali geni di virulenza dei VTEC: *vtx1*, *vtx2* (gruppo) e il gene *eae*

codificante l'intimina, fattore dell'adesione *attaching/effacing*. Lo studio è stato quindi strutturato come un *proficiency test* per valutare la *performance* dei laboratori partecipanti, utilizzando un metodo proposto dal CRL-VTEC (allegato 1). Come nello studio del 2007, è stata richiesta la determinazione del sierogruppo (antigene O) e, in modo facoltativo, la dimostrazione della capacità di produrre VT mediante saggi fenotipici.

Ai laboratori è stato inoltre proposto di esaminare gli stessi ceppi mediante Real-Time PCR, utilizzando *primer* e *probe* descritti in una linea-guida proposta dal CRL-VTEC (allegato 2), basata su un protocollo per la ricerca dei VTEC negli alimenti elaborato del Gruppo di Lavoro CEN/TC 275/WG6 e attualmente in corso di valutazione per essere proposto come standard internazionale. Questo protocollo prevedeva l'identificazione dei geni di virulenza e di geni sierogruppo-specifici per i principali sierogruppi patogeni: O157, O26, O103, O111, O145.

Lo studio era quindi costituito da 4 fasi:

1. Identificazione e caratterizzazione di ceppi VTEC mediante amplificazione PCR dei loro principali geni di virulenza, utilizzando il metodo proposto dal CRL-VTEC.
2. Determinazione del sierogruppo (antigene O): i ceppi appartenevano a sierogruppi frequentemente coinvolti nelle infezioni umane.
3. Dimostrazione della capacità di produrre VT mediante saggi fenotipici (facoltativo).
4. Identificazione e caratterizzazione di ceppi VTEC mediante Real-Time PCR, utilizzando *primer* e *probe* descritti nella linea-guida proposta dal CRL-VTEC (facoltativo).

3- MATERIALI E METODI

Il campione oggetto di analisi era costituito da 7 ceppi di *E.coli*. Per ciascuno di essi veniva richiesto di identificare il sierogruppo O, la produzione di VT libera, la presenza dei geni *vtx1*, *vtx2* ed *eae*.

A ciascun laboratorio è stato richiesto di eseguire le determinazioni del sierogruppo e il saggio fenotipico di produzione della VT con i metodi in uso presso il laboratorio stesso, e di eseguire le amplificazioni PCR tradizionale e Real Time PCR seguendo i metodi proposti dal CRL-VTEC. Le caratteristiche dei ceppi sono riportate in tabella 1:

Le performance analitiche di ciascun partecipante al test sono state valutate in termini di:

- Concordanza (Kappa di Cohen)
- Sensibilità

- Specificità

Per il calcolo di tali parametri sono stati confrontati i risultati delle determinazioni analitiche ottenute dai laboratori con i valori reali (*gold standard*) dei ceppi oggetto di analisi.

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

Ceppo No.	Sierogruppo	Produzione di VT	vtx1	vtx2	eae
A08	O145	+	+	-	+
B08	O121	+	-	+	+
C08	O111	+	+	+	+
D08	O157	+	-	+	+
E08	O103	+	+	-	+
F08	O91	+	+	-	-
G08	O26	-	-	-	+

La stima del livello di concordanza ai risultati di ciascun laboratorio è stata ottenuta attraverso il calcolo del Kappa di Cohen. Si tratta di una misurazione dell'accordo sul risultato analitico ottenuto da diversi lettori (laboratori) sullo stesso campione analitico, indipendentemente dalla componente imputabile al caso. Per la valutazione dell'accettabilità del valore Kappa è stata utilizzata la griglia di giudizio proposta da *Fleiss J.L. (Statistical methods for rates and proportions, 1981)*. Pertanto valori di K superiori a 0,75 indicavano livelli di concordanza eccellenti, valori compresi tra 0,40 e 0,75 buona concordanza e valori inferiori a 0,45 livelli di concordanza scarsi.

La valutazione della sensibilità diagnostica è stata ottenuta in termini di rapporto tra il numero di campioni con esito positivo, ovvero correttamente identificati dal laboratorio, sul totale dei campioni realmente positivi (ovvero del determinato sierogruppo).

La valutazione della specificità diagnostica è stata ottenuta in termini di rapporto tra il numero di campioni con esito negativo, ovvero di sierogruppo diverso da quello in esame, secondo il laboratorio, sul totale dei campioni realmente negativi.

Per tutti i parametri è stato calcolato il relativo intervallo di confidenza (95% I.C.); il calcolo dell'I.C. della sensibilità e specificità diagnostica relative al sierogruppo è stato eseguito riponderando il numero delle determinazioni analitiche all'effettiva numerosità dei campioni analizzati.

4 - RISULTATI DELLE PROVE PREVISTE NELLE FASI 1-3

Complessivamente sono state eseguite 278 determinazioni analitiche con una media, per ciascun laboratorio pari a 27,8. Dei laboratori partecipanti nessuno ha eseguito tutte le 35 prove proposte, 3 laboratori hanno eseguito oltre 30 prove, altri 6 laboratori hanno effettuato un numero di test compreso tra 25 e 30 ed un solo laboratorio un numero inferiore a 20 test (19). Il numero delle prove per ciascun laboratorio partecipante è riportato nella fig. 1.

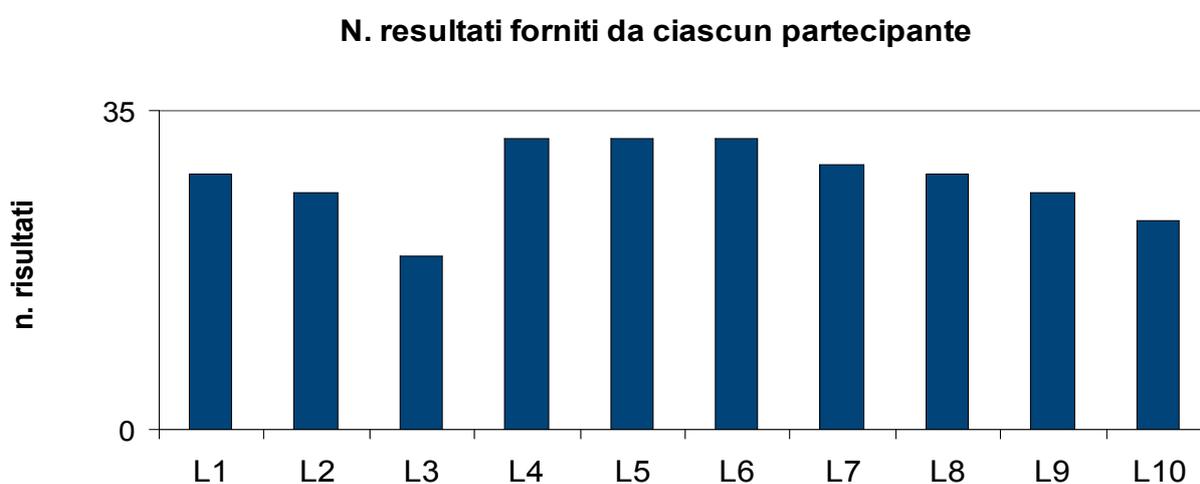


Figura 1 – Numero di prove eseguite da ciascun laboratorio partecipante allo studio

Tutti i laboratori hanno eseguito i saggi per la caratterizzazione molecolare dei ceppi (identificazione dei geni *vtx1*, *vtx2*, *eae*), mentre l'identificazione del sierogruppo O e la dimostrazione della capacità di produrre VT ha coinvolto un numero inferiore di laboratori. I risultati delle determinazioni analitiche eseguite dai laboratori partecipanti e l'accordo con il valore di gold standard per ciascuna caratteristica sono riportate nella tabella 2.

Tabella 2. Risultati analitici per le fasi 1, 2 e 3 dei laboratori partecipanti al ring test e loro concordanza con il valore gold standard

test	ceppo lab		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
	sierogruppo	A08	O145	v	v	nd	v	v	v	nd	v	v
B08		O121	FALSO	nd	nd	nd	nd	nd	nd	FALSO	nd	nd
C08		O111	v	v	nd	v	v	v	nd	FALSO	v	nd
D08		O157	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
E08		O103	v	v	nd	v	v	v	nd	v	v	FALSO
F08		O91	FALSO	nd	nd	nd	nd	nd	nd	v	nd	nd
G08		O26	v	v	nd	v	v	v	nd	v	v	nd
produzione VT		A08	VT+	nd	nd	nd	v	v	v	v	nd	nd
	B08	VT+	nd	nd	nd	v	v	v	FALSO	nd	nd	nd
	C08	VT+	nd	nd	nd	v	v	v	v	nd	nd	nd
	D08	VT+	nd	nd	nd	v	v	v	v	nd	nd	nd
	E08	VT+	nd	nd	nd	v	v	v	v	nd	nd	nd
	F08	VT+	nd	nd	nd	v	v	v	v	nd	nd	nd
	G08	VT -	nd	nd	nd	v	v	v	v	nd	nd	nd
vtx1	A08	vtx1+	v	v	nd	v	v	v	v	v	v	v
	B08	vtx1-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	C08	vtx1+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	D08	vtx1-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	E08	vtx1+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	F08	vtx1+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	G08	vtx1-	FALSO	v	v	v	v	v	v	v	v	v
vtx2	A08	vtx2-	v	v	nd	v	v	v	v	v	v	v
	B08	vtx2 +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	C08	vtx2 +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	D08	vtx2 +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	E08	vtx2-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	F08	vtx2-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	G08	vtx2-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
eae	A08	eae +	v	v	nd	v	v	v	v	v	v	v
	B08	eae +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	FALSO
	C08	eae +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	D08	eae +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	E08	eae +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	F08	eae-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	G08	eae +	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v

4.1 Prove

Complessivamente, è risultato corretto il 97% delle 278 determinazioni analitiche eseguite. Figura 2 riporta il numero di risultati corretti per ognuno sei test. Il maggior numero di errori analitici si è verificato per la determinazione del sierogruppo VTEC.

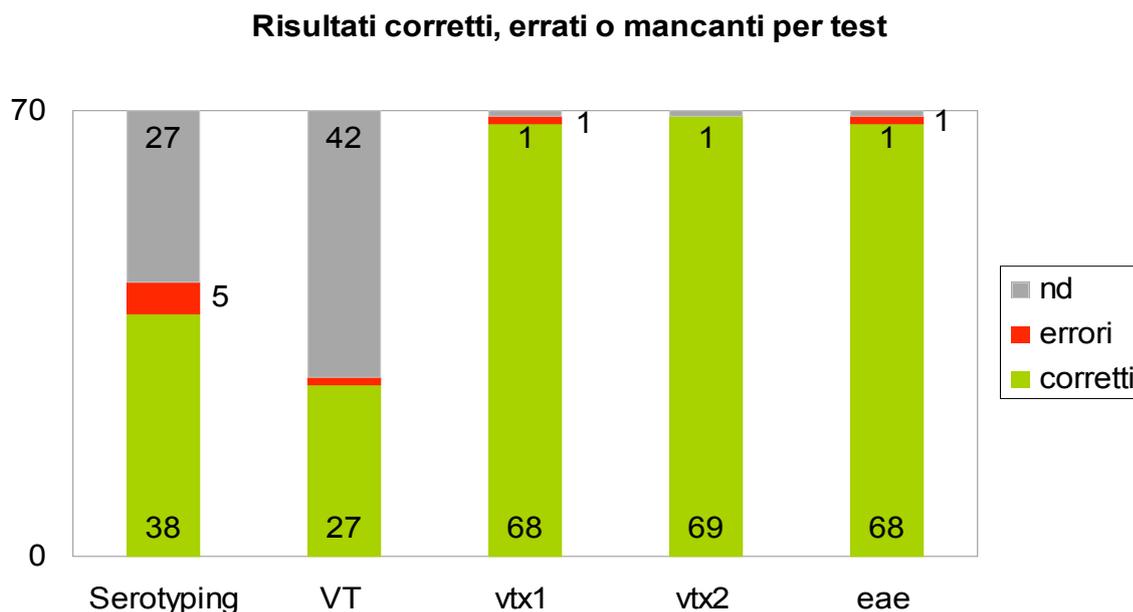


Figura 2 – Disponibilità e correttezza dei risultati, per saggio diagnostico.

4.1.1 Identificazione del sierogruppo

L'identificazione del sierogruppo è stata eseguita correttamente da tutti i Laboratori partecipanti per VTEC O157, il più importante dal punto di vista epidemiologico. Sette Laboratori sono risultati attrezzati anche per la sierotipizzazione dei più comuni sierogruppi VTEC associati a infezioni umane gravi (O26, O103, O111, O145) e hanno eseguito correttamente l'identificazione di quasi tutti questi ceppi (2 errori su 28 determinazioni analitiche). L'identificazione dei due sierogruppi meno comuni (O91 e O121) è stata eseguita correttamente in un solo caso, mentre sono stati riportati 4 errori diagnostici. In sintesi, i ceppi VTEC O157, O26 e O145 sono stati identificati correttamente da tutti i laboratori mentre sono stati commessi errori di identificazione per i ceppi O103, O111, O91 e O121.

Metodo utilizzato: siero-agglutinazione

- Concordanza complessiva - K: 0,86 (CI 95%: 0,7 – 1)
- Sensibilità: 85% (55% – 100%)
- Specificità: 99% (97% – 100%)

4.1.2 Identificazione della produzione di VT

Il saggio diagnostico per la produzione di VT è stato eseguito da 4 laboratori; tre di questi

hanno correttamente identificato le caratteristiche dei 7 ceppi, mentre uno a fornito un risultato sbagliato (falso negativo, tabella 2).

Metodo utilizzato: saggio su cellule Vero o test immuno-enzimatico EIA

- Concordanza complessiva - K: 0,86
- Sensibilità: 96% (77% – 100%)
- Specificità: 100% (40% – 98%)

4.1.3 Identificazione del gene *vtx1*

L'identificazione del gene *vtx1* è stata eseguita da tutti i laboratori partecipanti al test. Un laboratorio ha eseguito la determinazione solo per 6 ceppi. Tutti i Laboratori hanno correttamente identificato tutti i campioni, ad eccezione di un Laboratorio che ha erroneamente identificato un ceppo negativo come *vtx1+* (falso positivo, tabella 2)

Metodo utilizzato: PCR

- Concordanza complessiva - K: 0,97 (91% – 100%)
- Sensibilità: 100% (89% – 100%)
- Specificità: 97% (81% – 100%)

4.1.4 Identificazione del gene *vtx2*

L'identificazione del gene *vtx2* è stata eseguita da tutti i Laboratori partecipanti al test che hanno correttamente identificato tutti i campioni. Un laboratorio ha eseguito la determinazione solo per 6 ceppi.

Metodo utilizzato: PCR

- Concordanza complessiva - K: 1,00
- Sensibilità: 100% (94% – 100%)
- Specificità: 100% (95% – 100%)

4.1.5 Identificazione del gene *eae*

L'identificazione del gene *eae* è stata eseguita da tutti i laboratori partecipanti al test. Un laboratorio ha eseguito la determinazione solo per 6 ceppi. La presenza/assenza del gene *eae* è stata correttamente identificata in tutti i campioni ad eccezione di un laboratorio che ha riportato un falso negativo (tabella 2).

Metodo utilizzato: PCR

- Concordanza complessiva - K: 94% (83% – 95%)
- Sensibilità: 94% (90% - 100%)

- Specificità: 100% (66% - 100%)

5 - RISULTATI DELLE PROVE PREVISTE DALLA FASE 4

Questa fase facoltativa prevedeva l'utilizzo di un protocollo di Real Time PCR per l'identificazione dei geni di virulenza e di geni sierogrupo-specifici dei principali sierogruppi patogeni.

Solo tre laboratori hanno partecipato a questa fase: due hanno effettuato la ricerca di tutti i geni target proposti, uno dei soli geni di virulenza. I tre laboratori hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei geni target in tutti ceppi (Tabella 3).

Tabella 3. Risultati analitici per la fase 4 dei laboratori partecipanti al ring test e loro concordanza con il valore gold standard

<i>gene</i>	<i>ceppo</i>	<i>lab</i>	<i>L4</i>	<i>L6</i>	<i>L9</i>
sierograppo	A08	O145	v	v	nd
	B08	O121	v ^a	v ^a	nd
	C08	O111	v	v	nd
	D08	O157	v	v	nd
	E08	O103	v	v	nd
	F08	O91	v ^a	v ^a	nd
	G08	O26	v	v	nd
vtx1	A08	vtx1+	v	v	v
	B08	vtx1-	v	v	v
	C08	vtx1+	v	v	v
	D08	vtx1-	v	v	v
	E08	vtx1+	v	v	v
	F08	vtx1+	v	v	v
	G08	vtx1-	v	v	v
vtx2	A08	vtx2-	v	v	v
	B08	vtx2 +	v	v	v
	C08	vtx2 +	v	v	v
	D08	vtx2 +	v	v	v
	E08	vtx2-	v	v	v
	F08	vtx2-	v	v	v
	G08	vtx2-	v	v	v
eae	A08	eae +	v	v	v
	B08	eae +	v	v	v
	C08	eae +	v	v	v
	D08	eae +	v	v	v
	E08	eae +	v	v	v
	F08	eae-	v	v	v
	G08	eae +	v	v	v

^a Identificato correttamente come negativo per i sierogruppi inclusi nel metodo