

Risultati del 5° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) - 2010

Il 5° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è stato organizzato nel 2010 dal Laboratorio Nazionale di Riferenza (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità. Poiché il Laboratorio è anche Laboratorio Europeo di Riferenza (EU-RL) per questo patogeno, il ring test nazionale è stato condotto contestualmente al ring test europeo. Quest'ultimo ha visto la partecipazione di 32 LNR attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare, rappresentanti 25 Stati Membri dell'Unione Europea, la Norvegia e la Svizzera.

1. PARTECIPANTI

Allo studio nazionale hanno partecipato 10 laboratori di 8 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

1. IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", sede di Teramo, Batteriologia
2. IZS delle Regioni Lazio e Toscana, sede di Roma, DO Controllo Alimenti
3. IZS delle Regioni Lazio e Toscana, sede di Roma, DO Diagnostica Generale
4. IZS Lombardia e Emilia Romagna, sede di Brescia, Reparto Batteriologia
5. IZS del Mezzogiorno, sede di Portici (NA), Diagnostica Biomolecolare
6. IZS del Mezzogiorno, sede di Furni (SA)
7. IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sede di Torino, Laboratorio Controllo Alimenti
8. IZS Puglia e Basilicata, sede di Foggia, Lab. Biotecnologie applicate agli alimenti
9. IZS Umbria e Marche, sede di Perugia, Lab. Contaminanti Biologici
10. IZS delle Venezie, sede di Cordenons (PN)

2. OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

I due precedenti test sull'identificazione dei VTEC condotti nel 2007 e 2008 (report disponibili [qui](#)) hanno dimostrato come la maggior parte dei laboratori fosse in grado di

identificare i principali geni di virulenza dei VTEC (*vtx1*, *vtx2*, *eae*) e tipizzare i principali sierogruppi VTEC associati a malattie gravi nell'uomo.

Questo test ha avuto l'obiettivo di consolidare la capacità di identificare i ceppi di *E. coli* come VTEC mediante amplificazione PCR dei loro geni di virulenza e di estendere lo spettro dei sierogruppi da tipizzare agli 11 riportati più frequentemente nelle infezioni umane nell'ambito del *Food and Waterborne Diseases (FWD) Surveillance Network of the European Centre for Disease Control (ECDC)*.

Lo studio era quindi costituito da 2 fasi:

1. Identificazione e caratterizzazione di ceppi VTEC mediante amplificazione PCR dei loro principali geni di virulenza, utilizzando i metodi proposti dal EU-RL VTEC.
2. Determinazione del sierogruppo (antigene O).

3. MATERIALI E METODI

Il materiale di prova era costituito da cinque ceppi di *E. coli* (campioni 1 - 5). Ai laboratori era richiesto di rilevare la presenza dei geni *vtx1* (gruppo), *vtx2* (gruppo) ed *eae* e di identificare il sierogruppo (antigene O o in alternativa i geni sierogruppo-associati) con metodo convenzionale o molecolare. Le procedure di PCR convenzionale o Real time per rilevare la presenza di geni di virulenza e sierogruppo-associati erano disponibili nel sito web dell' EU-RL VTEC ([link](#)). I ceppi di *E. coli* da utilizzare come controlli positivi sono stati forniti dal LNR.

3.1. Preparazione dei campioni

Le caratteristiche dei ceppi sono riportate in Tabella 1 e sono state considerate come *gold standard*.

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

Ceppo No.	Sierogruppo	Gene <i>vtx1</i> (group)	Gene <i>vtx2</i> (group)	Gene <i>eae</i> (intimin)
1	O121	-	+	+
2	O91	+	-	-
3	O113	+	+	-
4	O145	+	-	+
5	O111	-	-	+

3.2. Valutazione della stabilità e dell'omogeneità dei campioni

Il materiale di prova era costituito da colture batteriche seminate per infissione in flaconi di vetro borosilicato contenenti brodo nutriente agarizzato allo 0,3%. I ceppi, selezionati tra quelli presenti nella collezione batterica dell' LNR sulla base delle caratteristiche genetiche e fenotipiche richieste per il test, sono stati seminati il 12 maggio e incubati 18 ore a 37 °C +/-1 °C. Non è stata eseguita una specifica valutazione della stabilità in quanto precedenti esperienze indicavano che l'intervallo di tempo tra la preparazione dei campioni e la scadenza per la presentazione dei risultati non fosse tale da pregiudicare le caratteristiche dei ceppi oggetto di studio. L'omogeneità dei campioni è stata verificata secondo quanto prescritto dalla ISO 17043:2010, saggiando per le caratteristiche richieste tre set di campioni selezionati casualmente subito dopo la preparazione. Tutte le prove hanno prodotto i risultati attesi.

3.3. Invio dei campioni

I campioni, identificati con codici numerici a tre cifre assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio, sono stati mantenuti a 5°C +/- 3°C fino al momento della spedizione. Questa è stata effettuata il 17 Maggio mediante corriere. Ai laboratori è stato richiesto di registrare la data e l'ora di arrivo dei campioni.

3.4. 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 ([link](#)), 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. Prima di inserire i risultati della sierotipizzazione, ai laboratori è stato richiesto di indicare i sierogruppi che erano in grado di identificare.

3.5. Valutazione della *performance* dei laboratori

La *performance* dei laboratori è stata valutata mediante il calcolo dei seguenti indicatori:

- 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 campioni oggetto di analisi.

La valutazione del livello di concordanza è stata ottenuta attraverso il calcolo del Kappa di Cohen che permette di stimare l'accordo tra il risultato analitico e il valore gold standard, 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)* secondo la quale valori di $K \geq 0,75$ indicano livelli di concordanza eccellenti, valori $0,40 \leq K < 0,75$ buona concordanza e valori $K < 0,40$ livelli di concordanza scarsi.

La sensibilità diagnostica è stata definita come la proporzione di campioni positivi correttamente identificati e la specificità diagnostica come la proporzione di campioni negativi identificati correttamente. Per tutti i parametri è stato calcolato il relativo intervallo di confidenza (95% I.C.).

Per quanto riguardava la sierotipizzazione, la *performance* di ogni laboratorio è stata valutata tenendo conto dell'indicazione fornita dai laboratori sulla propria capacità di identificare un dato sierogruppo (paragrafo 3.4). Pertanto, la mancata identificazione di un sierogruppo è stata valutata come errore solo se il laboratorio aveva dichiarato di essere in grado di identificarlo.

4. RISULTATI

I campioni sono stati inviati il 17 Maggio e sono stati recapitati ai laboratori partecipanti il giorno successivo.

Dopo aver avviato le analisi, un laboratorio ha comunicato problemi con due dei campioni di prova, riportando la concomitante presenza di due diversi ceppi VTEC. Ulteriori analisi hanno mostrato che alcuni laboratori potevano aver ricevuto ceppi che avevano subito una contaminazione crociata durante la preparazione. Tale contaminazione ha coinvolto i campioni 1 e 2, contenenti VTEC O121 e VTEC O91, e si è verificata a una frequenza tale da non essere rivelata dalle prove di omogeneità effettuate prima dell'invio dei campioni. I campioni 1 e 2 sono stati pertanto esclusi dalla valutazione dei risultati.

4.1. Identificazione della presenza dei geni di virulenza mediante PCR

I risultati dei saggi PCR per l'identificazione della presenza dei geni di virulenza sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Risultati dei saggi PCR per l'identificazione della presenza dei geni di virulenza. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati.

Laboratorio	Identificazione dei geni nel:								
	Campione 3			Campione 4			Campione 5		
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>
Gold Standard	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L06	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L07	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L11	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L13	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L16	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L26	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L40	+	+	-	+	-	+	-	-	+
L43	+	+	-	+	+	+	-	+	+
L47	+	-	-	+	-	+	-	-	+
L52	+	+	-	+	+	+	+	-	+

Sette laboratori (70%) hanno identificato correttamente la presenza/assenza di tutti i geni target in tutti i ceppi. Tre laboratori hanno commesso errori nel rilevare la presenza dei geni *vtx*. In particolare, i laboratori L43 e L52 hanno riportato due risultati falsi positivi, rispettivamente per il gene *vtx2* e i geni *vtx1* e *vtx2*, e il laboratorio L47 ha riportato un risultato falso negativo per il gene *vtx2*.

4.2. Identificazione del sierogruppo O

Le informazioni sulla disponibilità di reagenti per l'identificazione del sierogruppo sono state fornite da tutti i 10 laboratori e sono riassunte nella Tabella 3.

Tabella 3. Disponibilità di reagenti per l'identificazione del sierogruppo da parte dei laboratori partecipanti

Numero (%) di laboratori potenzialmente capaci di identificare il sierogruppo:										
O157	O26	O103	O111	O145	O91	O121	O113	O128	O55	O146
8	7	8	10	9	3	3	1	2	2	1
(80%)	(70%)	(80%)	(100%)	(90%)	(30%)	(30%)	(10%)	(20%)	(20%)	(10%)

I campioni 4 e 5 ceppi erano costituiti da ceppi VTEC appartenenti a due (O145 e O111) dei cinque sierogruppi maggiormente associati a infezioni gravi nell'uomo. Il campione 3 era costituito da un ceppo VTEC O113, un sierogruppo compreso nella lista estesa di sierogruppi coinvolti nelle infezioni umane, secondo i dati di sorveglianza dell'ECDC.

I risultati dell'identificazione del sierogruppo sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4. Identificazione del sierogruppo. Le caselle verdi indicano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati e le caselle gialle le tipizzazioni non effettuate da parte di laboratori che avevano preventivamente dichiarato di non essere in grado di identificare quel sierogruppo.

	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Gold Standard	O113	O145	O111
L06	O N.T.	O145	O111
L07	O N.T.	O145	O111
L11	O N.T.	O145	O111
L13	O N.T.	O145	O111
L16	O N.T.	O145	O111
L26	O N.T.	O145	O111
L40	O N.T.	O145	O111
L43	O N.T.	O N.T.	O111
L47	O N.T.	O145	O111
L52	O N.T.	O145	O111

Nel complesso, i campioni 4 e 5 sono stati correttamente identificati da tutti i laboratori che avevano dichiarato di essere in grado di identificare i sierogruppi O145 e O111. Al contrario, nessun laboratorio è stato in grado di tipizzare il ceppo di VTEC O1113 del campione 3.

4.3 Valutazione della *performance* dei laboratori

Le *performance* analitiche dei laboratori partecipanti sono state valutate in termini di concordanza, sensibilità e specificità, considerando insieme i risultati della genotipizzazione e della identificazione del sierogruppo.

I livelli di concordanza tra i risultati tra i risultati ottenuti da ciascun laboratorio e il *gold standard* sono riportati in Tabella 5.

Tabella 5. Genotipizzazione e identificazione del sierogruppo: concordanza tra i risultati ottenuti e il *gold standard* (Kappa di Cohen). Le caselle verdi evidenziano i valori di $K > 0,75$ (concordanza eccellente), le caselle gialle i valori di K compresi tra 0,45 e 0,75 (concordanza buona) e le caselle rosse i valori $< 0,45$ (concordanza scarsa)

Laboratorio	Valori di K		
	K	95% CI inf	95% CI sup
L06	0,91	0,61	1
L07	1	0,61	1
L11	1	0,61	1
L13	1	0,57	1
L16	1	0,6	1
L26	1	0,64	1
L40	1	0,54	1
L43	0,72	0,24	1
L47	0,91	0,57	1
L52	0,82	0,43	1

Il valore complessivo di concordanza (K) è risultato 0,95 (CI: 0,82 – 1,0).

La sensibilità complessiva dei laboratori partecipanti è risultata del 97,5% (95% CI: 94,1% - 100%) e la specificità complessiva del 97,7% (IC 95% 95,6% - 99,9%). In Tabella 6 sono riportati i valori di sensibilità e specificità ottenuti da ciascun laboratorio.

Sei laboratori hanno ottenuto valori di sensibilità e specificità pari al 100%.

Tabella 6. Genotipizzazione e identificazione del sierogruppo: sensibilità e specificità per laboratorio. Le caselle rosse evidenziano i valori < 100%.

Lab	Valori di sensibilità (Se) e specificità (Sp) per laboratorio									
	L06	L07	L11	L13	L16	L26	L40	L43	L47	L52
Se	88%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	88%	100%
Sp	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	71%	100%	88%

5. Considerazioni

1. Sei dei 10 laboratori hanno effettuato correttamente tutte le analisi.
2. Tre laboratori hanno commesso errori nell'identificazione della presenza dei geni *vtx*. Questi errori possono pregiudicare la corretta identificazione di un ceppo di *E. coli* come VTEC e ulteriore attività di training dovrà essere pianificata per migliorare i livelli di performance a livello nazionale.
3. La capacità di identificare i cinque sierogruppi VTEC maggiormente coinvolti nelle infezioni umane è risultata molto buona (70%-100% dichiarata, 100% di sensibilità e specificità accertate). L'estensione ad altri sierogruppi costituirà uno degli obiettivi del programma di attività del LNR.