



EU Reference Laboratory for *E. coli*

*Department of Veterinary Public Health and Food Safety
Unit of Foodborne Zoonoses*

Istituto Superiore di Sanità



**Risultati del 13° test inter-laboratorio (PT13)
per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *Escherichia coli*
produttori di verocitotossina (VTEC)
o appartenenti ad altri gruppi di *E. coli* patogeni - 2014**

A cura di:

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

1. INTRODUZIONE

Negli anni scorsi, il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato sei test inter-laboratorio (PT1, PT2, PT5, PT6, PT10 e PT11) per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) o appartenenti ad altri gruppi di *E. coli* patogeni.

Nel 2014, il 13° test inter-laboratorio (PT13) ha riguardato l'identificazione di ceppi appartenenti ai pato-gruppi VTEC, *E. coli* Enteroaggregativi (EAggEC) ed *E. coli* Enteropatogeni (EPEC).

Lo studio aveva i seguenti obiettivi:

1. L'identificazione dei principali geni di virulenza dei VTEC/EPEC: *vtx1 group*, *vtx2 group* ed *eae*.
2. L'identificazione dei marcatori genici degli EAggEC.
3. L'identificazione del sierogruppo dei ceppi inviati.
4. La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx1* e *vtx2* mediante PCR.
5. Una terza valutazione esterna di qualità sulla tipizzazione molecolare dei ceppi mediante PFGE, in vista dell'inizio della raccolta dei dati di sorveglianza molecolare, previsto per il 2015, nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi coordinate dall'EFSA.

In questo rapporto sono presentati e valutati i risultati relativi alla ricerca e alla tipizzazione dei geni virulenza e quelli relativi alla 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. Il report di quello studio è disponibile presso il sito web dell'EU-RL (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT13.pdf).

2. STRUTTURA DELLO STUDIO INTERLABORATORIO

Lo studio è stato condotto secondo quanto prescritto dalla norma ISO/IEC 17043:2010 "Conformity assessment – General requirements for proficiency testing" ed era articolato in tre parti:

1. L'identificazione dei pato-gruppi di *E. coli* attraverso l'amplificazione dei rispettivi geni *target* di virulenza, effettuata con metodiche PCR. I geni di virulenza ricercati erano:
 - i geni *vtx1* gruppo, *vtx2* gruppo ed *eae* (intimina) per i VTEC;
 - il gene *eae* per gli EPEC;

- i geni *aaIC* e *aggR*, coinvolti nell'adesione entero-aggregativa, per gli EA_gEC.
2. La tipizzazione sierologica dei ceppi, identificando quelli appartenenti a 13 sierogruppi selezionati per la loro rilevanza epidemiologica:
- O26, O103, O111, O145, and O157: i cosiddetti “top 5”, perché maggiormente coinvolti nelle infezioni umane gravi.
 - O45 and O121: epidemiologicamente rilevanti e considerati dalla normativa USA come adulteranti nei prodotti carnei.
 - O104: rilevante dopo l'epidemia verificatisi nel 2011 in Germania.
 - O55, O91, O113, O128, O146: selezionati sulla base della loro prevalenza nelle infezioni umane negli ultimi cinque anni, secondo quanto riportato dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC).
3. La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* identificati. Ai partecipanti è stato richiesto di identificare i sotto-tipi dei geni *vtx1* (*vtx1a*, *vtx1c* e *vtx1d*) e *vtx2* (da *vtx2a* a *vtx2g*).

3. PARTECIPANTI

Al test hanno aderito 15 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Batteriologia/ Laboratorio Regionale di Riferimento per Enterobatteri Patogeni (LRREP-A), 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, Reparto Batteriologia, Brescia
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Rif. Reg. Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS del Mezzogiorno, U.O. Diagnostica, Sezione di Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O. Microbiologia Alimentare, Sezione di Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O.S."Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM", Portici (NA)
- IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo
- IZS Venezie, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

Il campione oggetto di analisi era costituito da sette ceppi di *E. coli* (campioni 1-7), selezionati tra quelli della collezione batterica dell'EU-RL VTEC e controllati per i caratteri genetici e fenotipici oggetto dello studio.

Le caratteristiche dei ceppi sono riportate nella Tabella 1 e sono state considerate come “valori veri” (*gold standard*).

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

Ceppo	Pato-gruppo	Siero-gruppo	Gene di virulenza (<i>vtx subtype</i>)				
			<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
1	VTEC	O145	<i>vtx1a</i>	-	+	-	-
2	VTEC	O91	-	<i>vtx2d</i>	-	-	-
3	EAggEC	O104	-	-	-	+	+
4	VTEC	O146	<i>vtx1c</i>	<i>vtx2a, vtx2b</i>	-	-	-
5	VTEC	O128	-	<i>vtx2b</i>	-	-	-
6	VTEC	O157 (sorbitol fermenting)	-	<i>vtx2a</i>	+	-	-
7	EPEC	O45	-	-	+	-	-

I campioni erano costituiti da colture batteriche seminate per infissione in agar molle e sono stati identificati con codici numerici a tre/quattro cifre assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio. I campioni sono stati preparati il 2 e 3 Aprile 2014 e inviati ai partecipanti il 7 Aprile mediante corriere.

Per quanto riguarda la stabilità dei campioni, l'esperienza precedente indicava che l'intervallo temporale tra la preparazione e la data fissata per la presentazione dei risultati da parte dei laboratori era tale da garantire la stabilità delle caratteristiche dei ceppi batterici oggetto di studio. L'omogeneità dei campioni è stata verificata secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010.

4.2. Metodi di laboratorio

L'identificazione dei pato-gruppi di *E. coli* è stata effettuata mediante amplificazione dei rispettivi geni *target* di virulenza, utilizzando le procedure PCR (*end point* o *real time*) disponibili nel sito web dell'EU-RL, sezione *Laboratory Methods*. Anche i metodi PCR per la ricerca dei geni associati ai sierogruppi (sierotipizzazione molecolare) e per la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* erano disponibili nel sito web dell'EU-RL.

4.3. 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), previa identificazione tramite *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.

4.4. Analisi dei risultati

4.4.1. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza

La performance analitica dei laboratori nella ricerca dei geni *target* di virulenza dei diversi pato-gruppi di *E. coli* 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** per ogni risultato errato 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** per ogni risultato errato riguardante l'identificazione degli altri geni di virulenza presi in considerazione nel PT (*eae*, *AggR*, *aaiC*).
- **1 punto** per 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*.

4.4.2. 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 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: O45, O55, O91, O104, O113, O121, O128, O146.

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".

4.4.3. Valutazione della performance dei laboratori nella tipizzazione dei geni vtx

La performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni vtx è stata valutata assegnando 1 punto di penalità per ogni gene identificato in maniera errata o per 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, un punteggio superiore a 4 punti è stato fissato per definire una performance non adeguata.

5. RISULTATI

5.1. Identificazione dei geni di virulenza e valutazione della performance dei laboratori in questi test

I risultati dei test PCR per la ricerca dei geni di virulenza nei singoli ceppi di *E. coli* sono riportati nella Tabella 2 (1-3). La Tabella 3 riassume invece i risultati complessivi per i 7 ceppi test.

Tutti i laboratori hanno effettuato la ricerca dei geni vtx ed eae, mentre 2 laboratori non hanno riportato tutti i risultati dei test per i geni target degli EAggEC.

Tabella 2 (1). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 1, 2 e 3). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il risultato del test non è stato riportato.

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	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L117															
L235				ND	ND										
L237															
L250															
L256															
L320															
L365															
L369															
L492															
L508				ND	ND				ND	ND				ND	ND
L689															-
L707															
L904															
L984															
L991						+									

Tabella 2 (2). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 4 e 5). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il risultato del test non è stato riportato.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:									
	Ceppo 4					Ceppo 5				
	<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	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
L117										
L235										
L237										
L250										
L256										
L320										
L365										
L369										
L492										
L508				ND	ND		-		ND	ND
L689										
L707										
L904										
L984										
L991										

Tabella 2 (3). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 6 e 7). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il risultato del test non è stato riportato.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:									
	Ceppo 6					Ceppo 7				
	<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	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
L117										
L235				ND	ND				ND	ND
L237										
L250										
L256										
L320										
L365	+		-							
L369										
L492										
L508		-		ND	ND				ND	ND
L689										
L707										
L904										
L984										
L991										

Tabella 3. 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 7 ceppi test. i numeri nelle caselle rosse e bianche indicano rispettivamente i risultati errati e quelli non riportati.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nei 7 ceppi test:				
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>
L117					
L235				3	3
L237					
L250					
L256					
L320					
L365	1		1		
L369					
L492					
L508		2		7	7
L689					1
L707					
L904					
L984					
L991	1				

Dieci laboratori (67 %) hanno identificato correttamente la presenza/assenza di tutti i geni target in tutti i ceppi test, mentre gli altri 5 laboratori hanno prodotto un totale di 6 risultati errati. Per quanto riguardava la presenza dei geni *vtx*, 12 laboratori (80 %) hanno identificato correttamente tutti i ceppi test, mentre gli altri 3 laboratori hanno prodotto 2 risultati errati per *vtx1* (2 falsi positivi) e 2 per *vtx2* (2 falsi negativi). Il gene *eae* è stato identificato correttamente da 14 laboratori (93 %) e i geni target degli EAggEC da 12 dei 13 laboratori che hanno riportato tutti i risultati.

La performance analitica dei laboratori nella ricerca dei geni di virulenza è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 4.4.1.

La Figura 1 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti e la Figura 2 il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto.

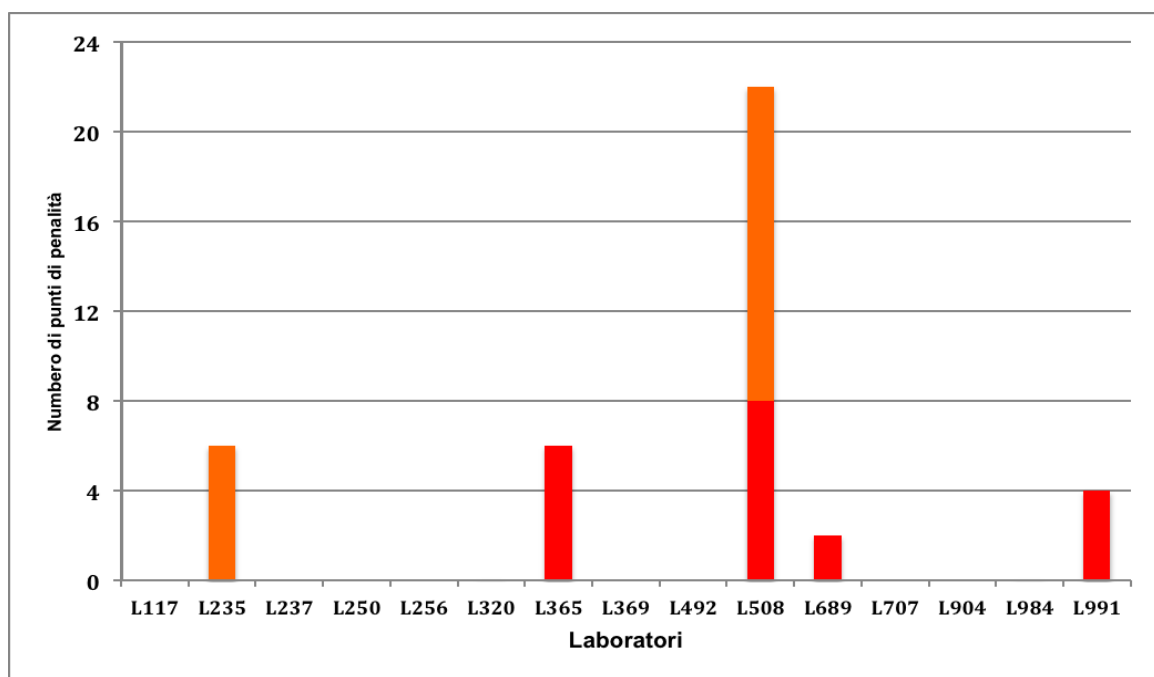


Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.1. Le barre rosse indicano i punti assegnati per risultati errati e le bande gialle quelli assegnati per risultati non riportati.

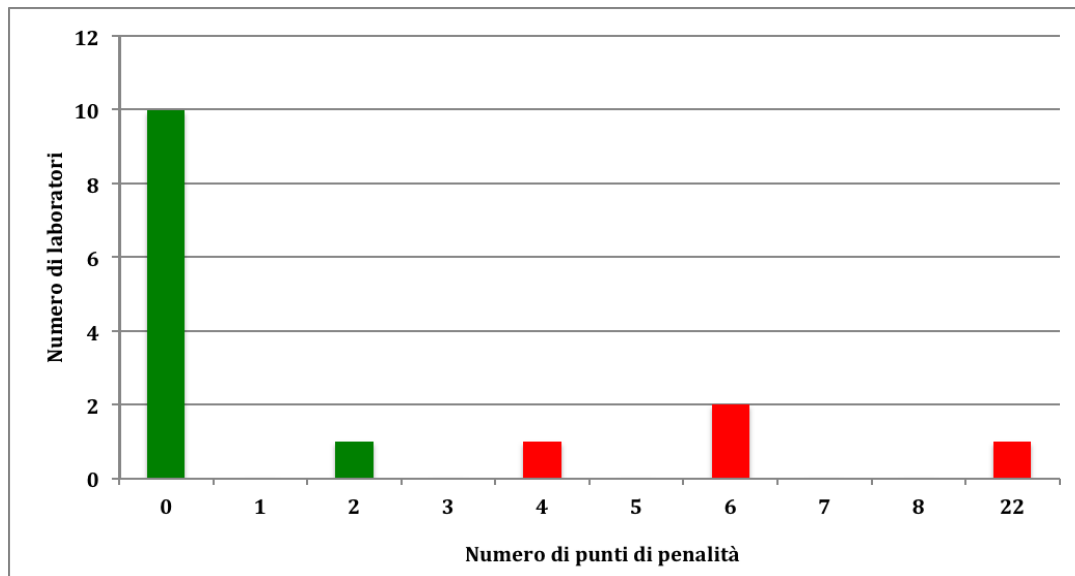


Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza: numero di laboratori per punteggio. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.1. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata

Quattro laboratori hanno conseguito un punteggio uguale o superiore a 4, e pertanto la loro performance non è stata considerata adeguata. Per uno di questi laboratori (L235), i punti di penalità erano interamente dovuti a risultati non riportati, riguardanti i test per geni target degli EAggEC.

5.2. Identificazione del sierogruppo O dei ceppi test e valutazione della performance dei laboratori in questo test

La Tabella 4 riporta i risultati relativi all'identificazione del sierogruppo dei ceppi test. Tredici laboratori hanno utilizzato il metodo per la sierotipizzazione molecolare proposto dall'EU-RL. Undici laboratori (73 %) hanno identificato correttamente il sierogruppo dei 7 ceppi inclusi nello studio. Gli altri 4 laboratori hanno prodotto in totale 13 risultati errati. In particolare, un laboratorio (L508) non ha effettuato la sierotipizzazione del ceppo 1, appartenente ai sierogruppi "top 5" (VTEC O145) e tre laboratori non hanno identificato i sierogruppi O91, O104, O128 e O146.

La performance analitica dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 4.4.2. La Figura 3 mostra il punteggio ottenuto da ciascun Laboratorio, mentre nella Figura 4 i Laboratori sono suddivisi in base al punteggio conseguito. Tre laboratori hanno conseguito un punteggio maggiore di 4 e la loro performance è stata quindi considerata non adeguata.

Tabella 4. Identificazione del sierogruppo O. 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.

Lab	Identificazione del sierogruppo nel ceppo:						
	1	2	3	4	5	6	7
Valore atteso	O145	O91	O104	O146	O128	O157	O45
L117							
L235					NT		
L237							
L250							
L256							
L320							
L365		NT	NT	NT	NT		
L369							
L492							
L508	NT	NT	NT	NT			
L689							
L707							
L904							
L984							
L991		NT	O55	NT	O127a		

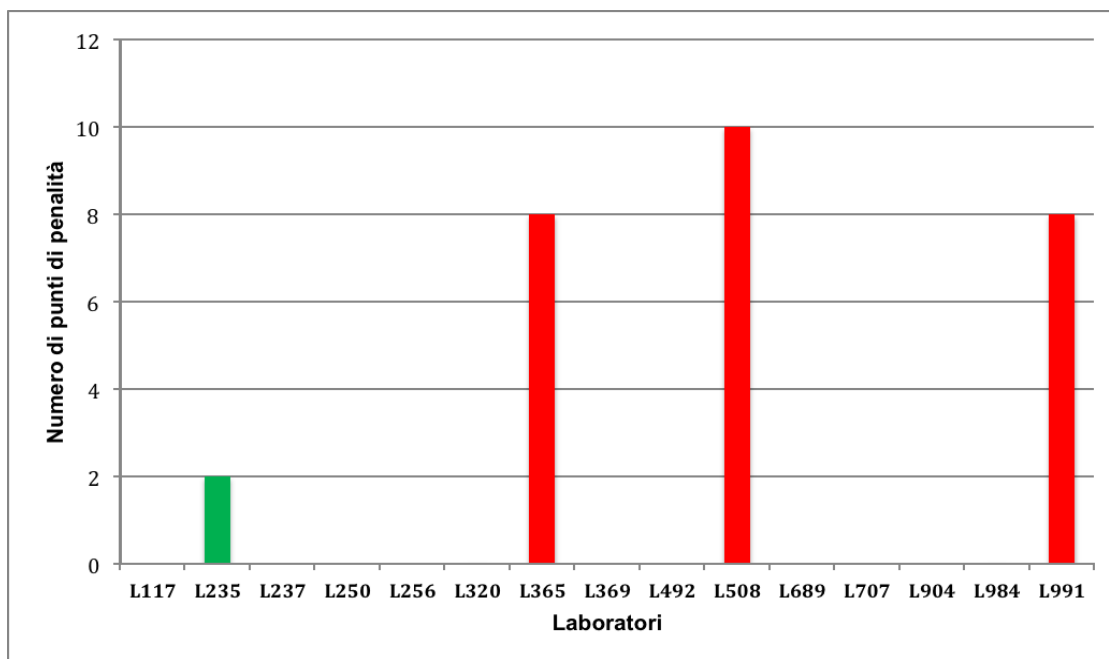


Figura 3. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.2. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance non è stata considerata adeguata.

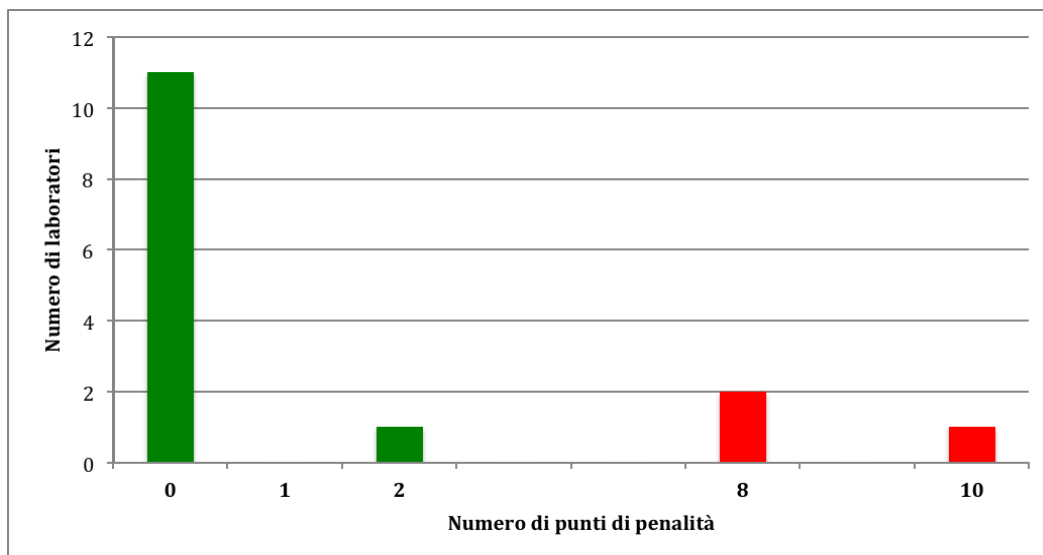


Figura 4. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O: numero di laboratori per punteggio conseguito. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.2. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

5.3. Identificazione delle varianti dei geni *vtx*

La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* è stata effettuata da 11 Laboratori. I risultati della tipizzazione del gene *vtx1* sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5. Identificazione delle varianti dei geni *vtx1* mediante PCR nei ceppi 1 e 4.

Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il risultato del test non è stato riportato.

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>vtx1</i> nel:					
	Ceppo 1			Ceppo 4		
	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>
Valore atteso	+	-	-	-	+	-
L117						
L235		ND	ND			
L237						
L250						
L256						
L365						
L369						
L492						
L707	-					
L904						
L991		ND	ND			

Otto laboratori hanno tipizzato correttamente le varianti geniche nei 2 ceppi *vtx1+*. Un laboratorio ha riportato un risultato falso negativo per la variante *vtx1a* e due laboratori non hanno riportato i risultati di alcuni test.

I risultati della tipizzazione delle varianti del gene *vtx2* sono riportati nelle Tabelle 6 (1-2).

Due laboratori hanno tipizzato correttamente tutte le varianti geniche nei 4 ceppi *vtx2+*. Gli altri 9 laboratori hanno riportato un totale di 17 risultati errati, tutti falsi positivi, la maggior parte dei quali riguardava le varianti *vtx2c* (11) e *vtx2g* (5). Per 4 laboratori gli unici risultati errati riguardavano la variante *vtx2c*. Due laboratori non hanno riportato i risultati di alcuni test.

Tabella 6 (1). Identificazione delle varianti dei geni *vtx2* mediante PCR nei campioni 2 e 4. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il risultato del test non è stato riportato.

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>vtx2</i> nel:													
	Ceppo 2							Ceppo 4						
	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>
Valore atteso	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L117			+							+				+
L235	ND	ND	ND		ND	ND	ND							
L237														
L250			+											
L256			+							+				+
L365			+											
L369			+											
L492			+							+				
L707														
L904			+											
L991														

Tabella 6 (2). Identificazione delle varianti dei geni *vtx2* mediante PCR nei campioni 5 e 6. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il risultato del test non è stato riportato.

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>vtx2</i> nel:													
	Ceppo 5							Ceppo 6						
	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>
Valore atteso	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L117							+			+				
L235	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+		ND	ND	ND	ND	ND	ND
L237														
L250														
L256							+							
L365														
L369														
L492														
L707														
L904	+													
L991								ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

I risultati della tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* sono riassunti nella Tabella 7.

Tabella 7. Identificazione delle varianti dei geni *vtx* mediante PCR: risultati complessivi. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; i numeri nelle caselle rosse e bianche indicano rispettivamente i risultati errati e quelli non riportati.

Lab	Identificazione delle varianti dei geni <i>vtx2</i> nei 7 ceppi test										
	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>	
L117						3					2
L235		1	1	2	3	3	2	3	3	1	2
L237											
L250						1					
L256						2					2
L365						1					
L369						1					
L492						2					
L707	1										
L904				1		1					
L991		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Un solo laboratorio ha tipizzato correttamente tutte le varianti geniche nei 5 ceppi VTEC. Un altro laboratorio non ha commesso errori, ma non ha riportato i risultati di alcuni test.

La performance analitica dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx* è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 4.4.3.

La Figura 5 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti e la Figura 6 il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto.

Tre laboratori hanno conseguito un punteggio maggiore di 4 a causa di risultati errati o non riportati e la loro performance è stata considerata non adeguata.

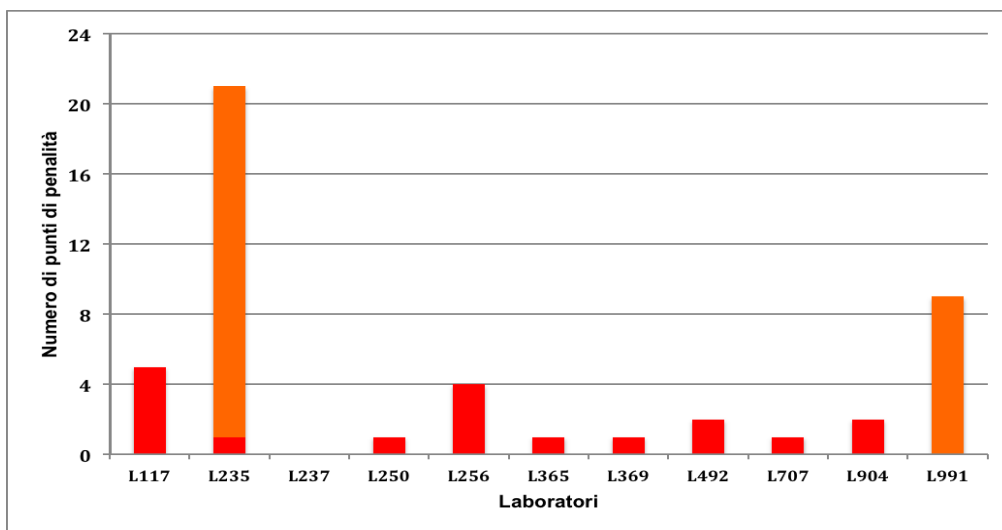


Figura 5. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx*. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.3. Le barre rosse indicano i punti assegnati per risultati errati e le bande gialle quelli assegnati per risultati non riportati.

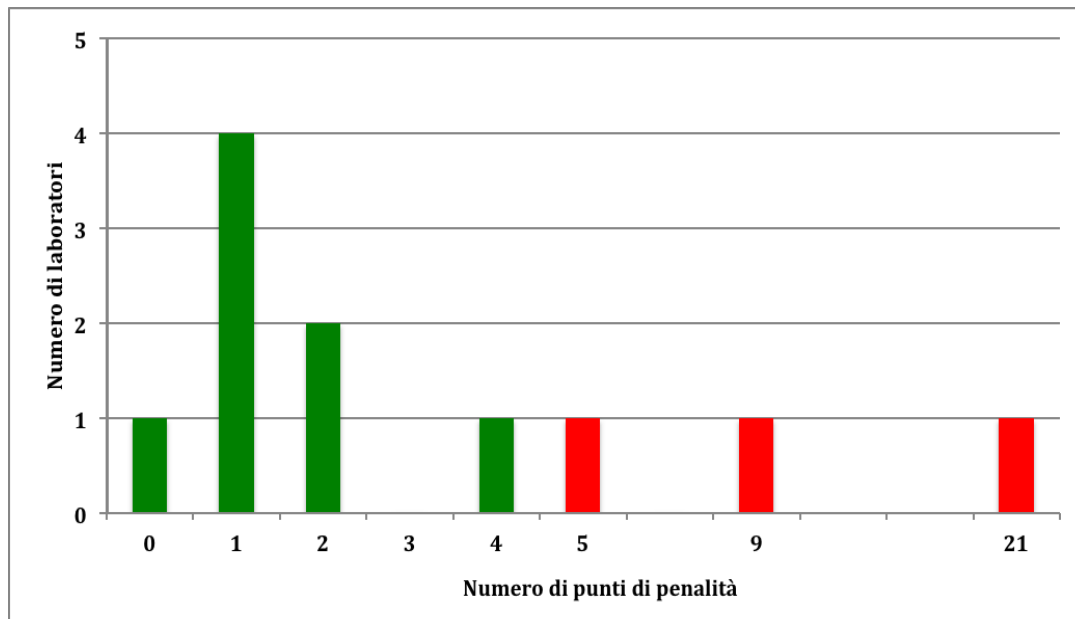


Figura 6. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx*: numero di laboratori per punteggio conseguito. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.3. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

6. CONSIDERAZIONI

1. Quindici laboratori di 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali hanno partecipato allo studio, con un aumento considerevole rispetto al numero dei partecipanti al precedente studio (PT11) sulla identificazione e caratterizzazione dei ceppi di *E. coli* patogeni (9 laboratori di 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali).
2. Dodici laboratori (80 %) hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei geni *vtx* ed *eae* nei 7 ceppi test.
3. I geni target degli EAggEC sono stati identificati correttamente da 12 (92 %) dei 13 laboratori che hanno riportato tutti i risultati relativi a questi test.
4. La performance nell'identificazione dei geni di virulenza è stata valutata non adeguata per 4 laboratori (27 %), che hanno riportato risultati errati o hanno omesso di riportarli.
5. Undici laboratori (73 %) hanno identificato correttamente il sierogruppo dei 7 ceppi inviati. La performance è stata valutata non adeguata per 3 Laboratori (20 %).
6. La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* è stata eseguita da 11 laboratori, rispetto ai 7 che avevano effettuato questi test nel corso del PT11.
7. Un solo laboratorio ha tipizzato correttamente tutte le varianti geniche nei 5 ceppi VTEC, ma la performance è stata valutata soddisfacente per 8 laboratori. La maggior parte dei risultati errati (17) era costituito da falsi positivi nella tipizzazione dei geni

vtx2, in particolare la variante *vtx2c*. Sette risultati errati riguardavano il ceppo 2, che possedeva invece il gene *vtx2d*. Questi risultati indicano che la specificità della reazione PCR per *vtx2c* è fortemente dipendente dalle condizioni di reazione e che la robustezza del metodo necessita ancora di una messa a punto.

8. In conclusione, i risultati di questo studio confermano che la maggior parte dei laboratori partecipanti è in grado di identificare correttamente i geni di virulenza e i principali sierogruppi dei ceppi VTEC, inclusi i ceppi VTEC/EAggEC O104, come richiesto dal Reg. (EC) 209/2013 sui criteri di sicurezza microbiologica dei germogli.