



EU Reference Laboratory for *E. coli*

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

Istituto Superiore di Sanità



Risultati del 1° test inter-laboratorio (PT-PFGE1) sulla tipizzazione molecolare di ceppi di *Escherichia coli* mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) – 2013

A cura di:

Alfredo Caprioli, Clarissa Ferreri, Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Stefano Morabito, Rosangela Tozzoli

1. INTRODUZIONE E OBIETTIVI

La tipizzazione molecolare dei batteri patogeni enterici è stata applicata con successo nelle indagini epidemiologiche sui focolai epidemici e negli studi sulle fonti di contaminazione degli alimenti. In particolare, la tecnica della Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) è da tempo utilizzata per la tipizzazione di ceppi di *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ed *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) nell'ambito di sistemi di sorveglianza molecolare di queste infezioni. Tra questi, la rete *PulseNet International*, diffusa in tutto il mondo (www.pulsenetinternational.org), ha contribuito ampiamente alla standardizzazione della tecnica PFGE.

In Europa, lo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) ha iniziato nel 2012 la raccolta di dati di tipizzazione molecolare, in particolare profili di PFGE, per i ceppi di *Salmonella*, *L. monocytogenes* e VTEC isolati da infezioni umane. A partire dal 2015, la DG SANCO ha deciso di estendere la raccolta di profili molecolari ai ceppi delle stesse specie batteriche isolati da alimenti e da animali, per migliorare le attività di sorveglianza e aumentare il livello di preparazione nei confronti dei focolai epidemici di origine alimentare. La raccolta sarà effettuata nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi previste dalla Direttiva CE 99/2003 e sarà coordinata dalla *European Food Safety Authority* (EFSA), che per tale attività si avvarrà del supporto tecnico e scientifico dei rispettivi Laboratori Europei di Riferimento (EU-RL). Secondo il mandato della DG SANCO, i dati di tipizzazione molecolare sugli isolati di origine alimentare e animale saranno principalmente prodotti dai Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) per i tre patogeni in questione, che saranno coadiuvati dalle rispettive reti nazionali di laboratori coinvolti nel controllo ufficiali degli alimenti.

Per preparare i laboratori a fare fronte alle richieste di EFSA di integrare i dati microbiologici sui ceppi di origine alimentare e animale con i relativi profili molecolari di PFGE, l'LNR per *E. coli* ha iniziato uno specifico programma di valutazione esterna di qualità (EQA) relativo alla tipizzazione di ceppi di *E. coli* mediante PFGE. Questo programma è iniziato nel 2013, includendo la PFGE nel 10° test inter-laboratorio (PT10) per l'identificazione e la tipizzazione dei VTEC. L'obiettivo principale di questo primo studio è stato quello di effettuare una prima ricognizione sul livello dei laboratori partecipanti e i risultati sono presentati in questo rapporto. Poiché l'LNR per *E. coli* è anche 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 cui report è disponibile al sito web dell'EU-RL (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT_PFGE1.pdf).

2. PARTECIPANTI

Hanno partecipato allo studio 6 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti a 6 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 Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto di Microbiologia, Brescia
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Roma
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS dell'Umbria e delle Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

Il campione oggetto di analisi era costituito da 11 ceppi di *E. coli*, selezionati tra quelli inviati ai laboratori per il PT10.

I ceppi (colture batteriche seminate per infissione in agar molle) 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. Raccolta e valutazione dei risultati

Ai laboratori partecipanti è stato richiesto di utilizzare la procedura in uso nel *PulseNet International Network* (disponibile all'indirizzo URL:

http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf) e di inviare via email le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, insieme allo schema di caricamento dei campioni, da allegare in formato Word o Excel.

La qualità delle immagini dei gel PFGE è stata valutata secondo i criteri descritti nella "Standard Operating Procedure for TIFF Quality Grading" del *PulseNet International Protocol (PNQ01)*". I criteri di valutazione sono riportati nella Tabella 1.

La performance di ogni laboratorio è stata valutata utilizzando gli stessi parametri in uso nella Rete PulseNet, assegnando giudizi da "POOR" a "EXCELLENT" ad ogni parametro (Tabella 1). Ogni giudizio è stato trasformato in un punteggio da 1 a 4 secondo il seguente schema:

Insufficiente (*Poor*): 1

Sufficiente (*Fair*): 2

Buono (*Good*): 3

Eccellente (*Excellent*): 4

Il valore medio per ogni parametro è stato calcolato sulla base del giudizio ottenuto dai sei laboratori partecipanti, utilizzando un valore soglia di 3 punti per determinare una performance soddisfacente per ogni parametro.

Considerando la complessità della procedura e il fatto che si trattava del primo test di questa natura, non è stata stabilita una soglia generale per identificare i laboratori con una performance non soddisfacente per l'intera procedura.

La somma dei punti ottenuti per tutti i parametri ha generato comunque un punteggio complessivo che, insieme ad un commento generale, è stato trascritto nel report individuale inviato ad ogni laboratorio, per scopi auto-valutativi. Nel report individuale sono contenuti anche suggerimenti per il miglioramento della qualità delle immagini, relativi ai punti specifici che hanno generato punteggi bassi.

Tabella 1. Giudizi per la valutazione della qualità delle immagini PFGE, secondo le linee guida PulseNet.

Parameter	Image Quality Grading Guidelines			
	Excellent	Good	Fair	Poor
Image acquisition and running conditions	As per PulseNet protocol: Gel fills whole TIFF. Wells included on TIFF. Bottom band of standard is between 1.0 cm and 1.5 cm from the bottom of the gel.	Gel does not fill whole TIFF but band finding is not affected.	Not protocol: only one of the following: Gel does not fill whole TIFF, and band finding is affected. Wells not included on the TIFF. The bottom band of a standard is not between 1.0 and 1.5 cm from the bottom of the gel. Band spacing of standards does not match the global standard.	Not protocol: more than one of the following: Gel doesn't fill whole TIFF and this affects band finding. Wells not included on TIFF. The bottom band of a standard is not between 1.0 and 1.5 cm from the bottom of the gel. Band spacing of standards does not match the global standard.
Cell suspensions	The cell concentration is approximately the same in each lane.	Up to two lanes contain darker or lighter bands than the other lanes.	More than two lanes contain darker or lighter bands than the other lanes, or at least one lane is much darker or lighter than the other lanes, making the gel difficult to analyse.	The cell concentrations are uneven from lane to lane, making the gel impossible to analyse.

Parameter	Image Quality Grading Guidelines			
	Excellent	Good	Fair	Poor
Bands	Clear and distinct all the way to the bottom of the gel.	Slight band distortion in one lane, but this does not interfere with analysis. Bands are slightly fuzzy and/or slanted. A few bands (three or less) are difficult to see clearly (DNA overload), especially at bottom of gel.	Some band distortion (e.g., nicks) in two to three lanes but still analysable. Fuzzy bands. Some bands (four to five) are too thick. Bands at the bottom of the gel are light, but analysable.	Band distortion that makes analysis difficult. Very fuzzy bands. Many bands too thick to distinguish. Bands at the bottom of the gel too light to distinguish.
Lanes	Straight.	Slight smiling (higher bands in the outside lanes than on the inside). Lanes gradually run longer toward the right or left. Still analysable.	Significant smiling. Slight curves on the outside lanes. Still analysable.	Smiling or curving that interferes with analysis.
Restriction	Complete restriction in all lane.	One to two faint shadow bands on the gel.	One lane with many shadow bands. A few shadow bands spread out over several lanes.	Two or more lanes with several shadow bands. Lots of shadow bands over the whole gel.
Gel background	Clear.	Mostly clear background. Minor debris present that does not affect analysis.	Some debris present that may or may not make analysis difficult (auto band search finds too many bands). Background caused by photographing a gel with very light bands (image contrast was "brought up" in photographing gel-makes image look grainy).	Lots of debris present that may or may not make analysis difficult (auto-band search finds too many bands).
DNA degradation (smearing in the lanes)	Not present.	Minor background (smearing) in a few lanes but bands are clear.	Significant smearing in one or two lanes that may or may not make analysis difficult. Minor background (smearing) in many lanes.	Significant smearing in more than two lanes that may or may not make analysis difficult. Smearing so that a lane is not analysable (except if untypeable [thiourea required]).

4. RISULTATI

Il punteggio generale ottenuto da ciascuno dei sei laboratori partecipanti allo studio è riportato nella Figura 1. I punteggi ottenuti per ogni singolo parametro sono riportati nelle Figure 2- 7.

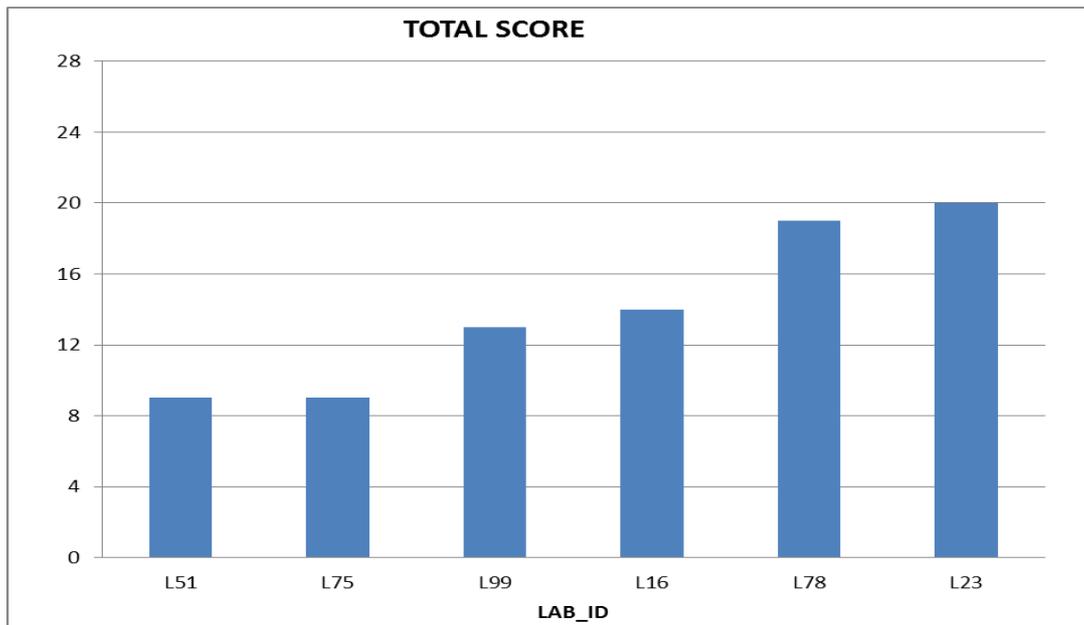


Figura 1. Punteggio generale ottenuto da ogni laboratorio partecipante al PT.

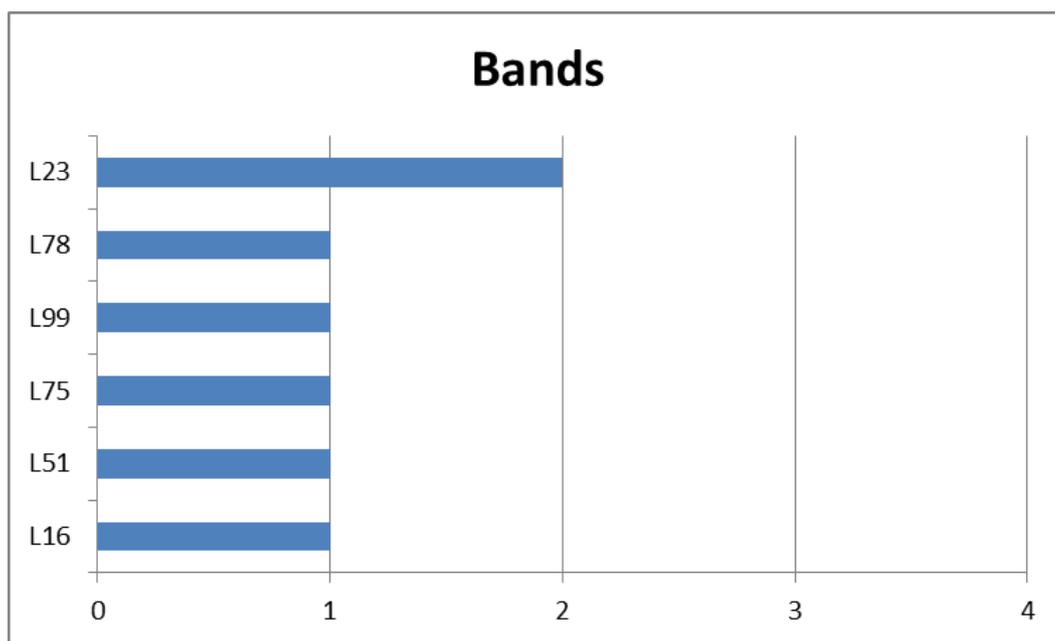


Figura 2. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro "bands". Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 1,17.

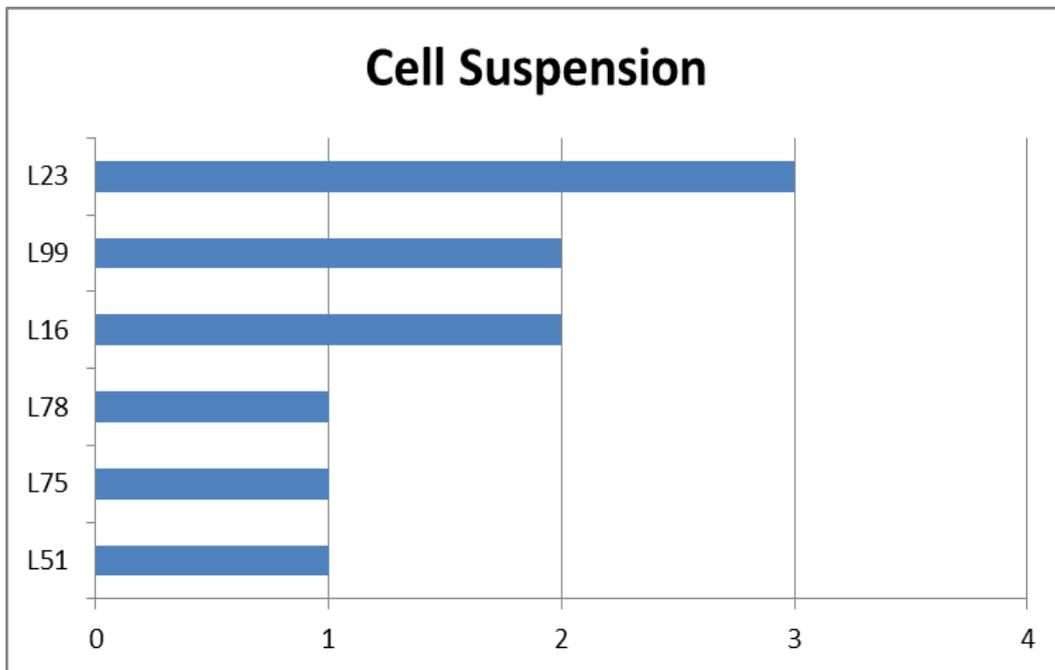


Figura 3. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro “*Cell suspension*”. Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 1,67.

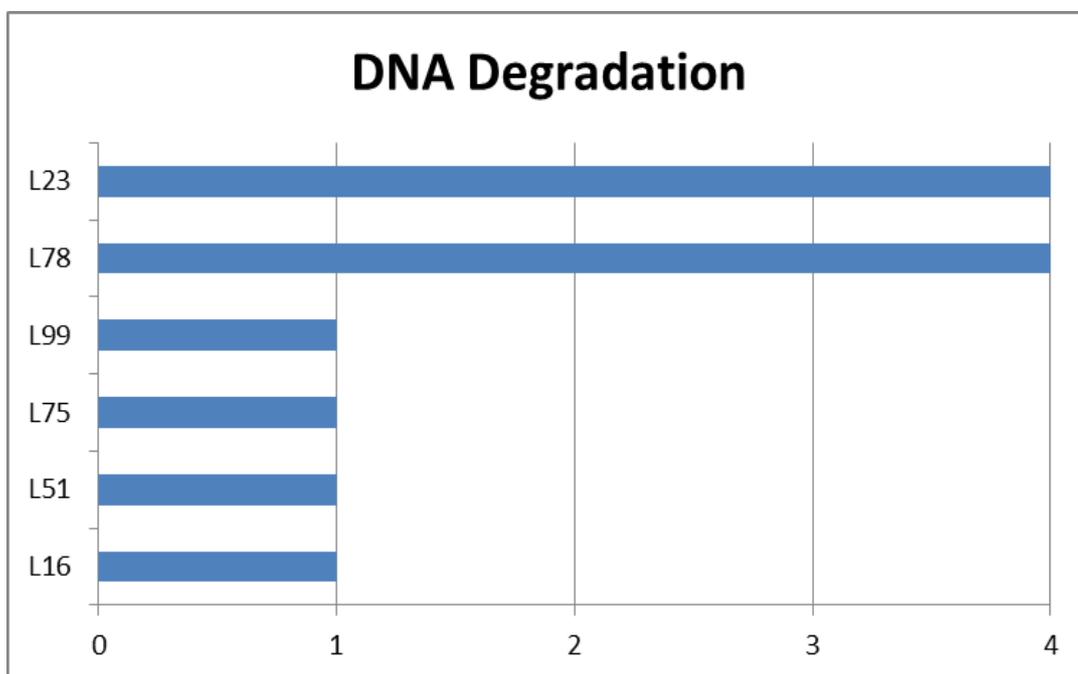


Figura 4. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro “*DNA degradation*”. Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 2,00.

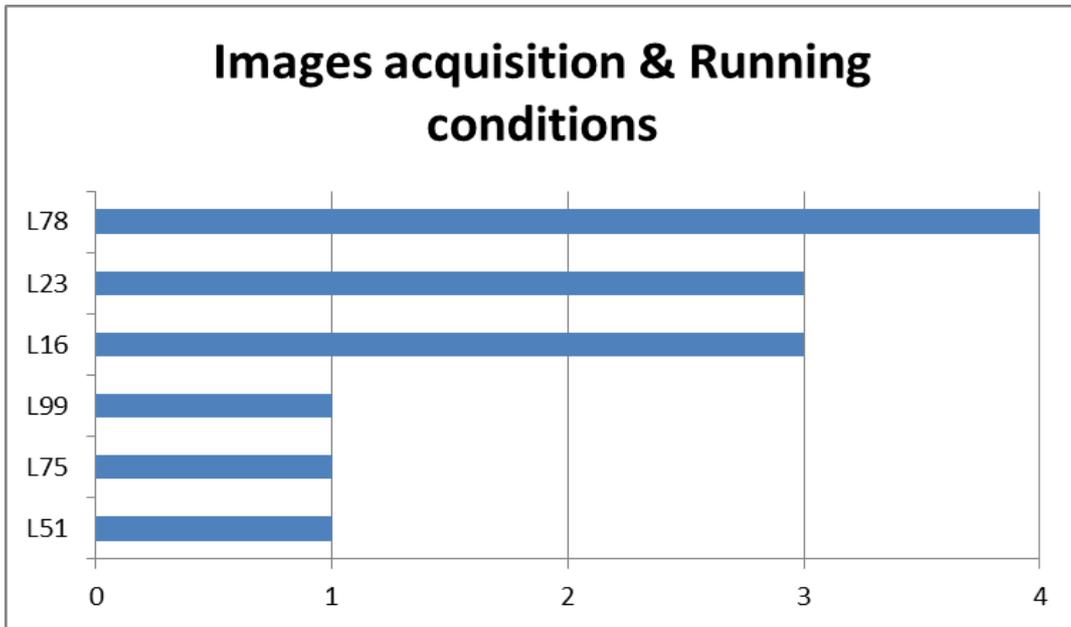


Figura 5. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro “*Image acquisition and running conditions*”. Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 2,17.

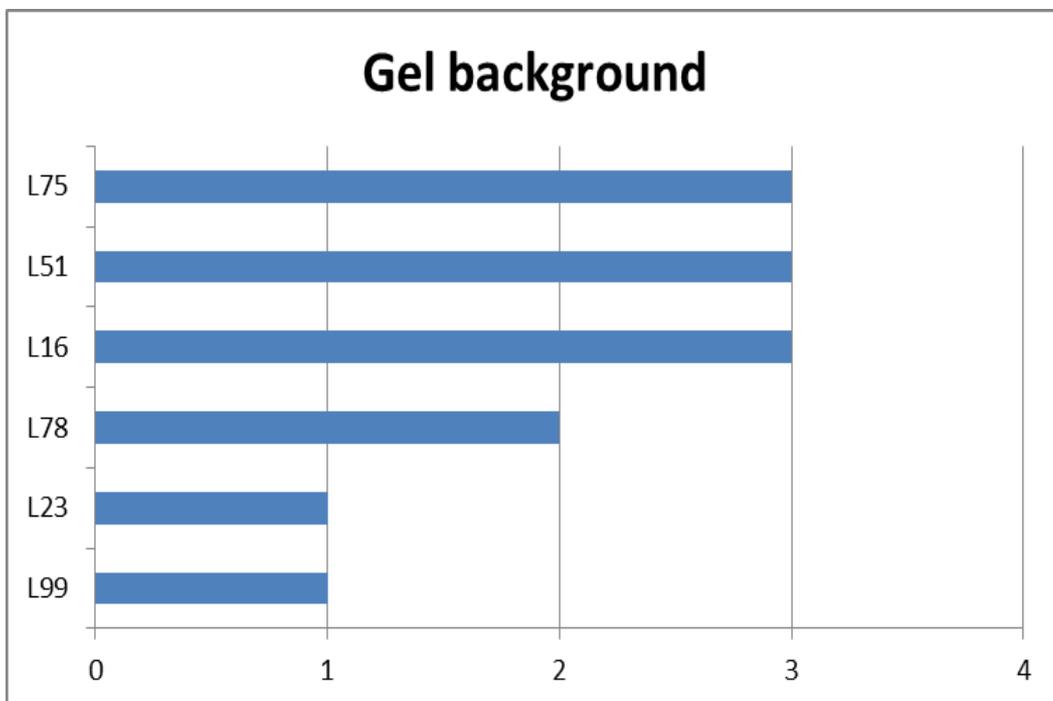


Figura 6. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro “*Gel background*”. Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 2,17.

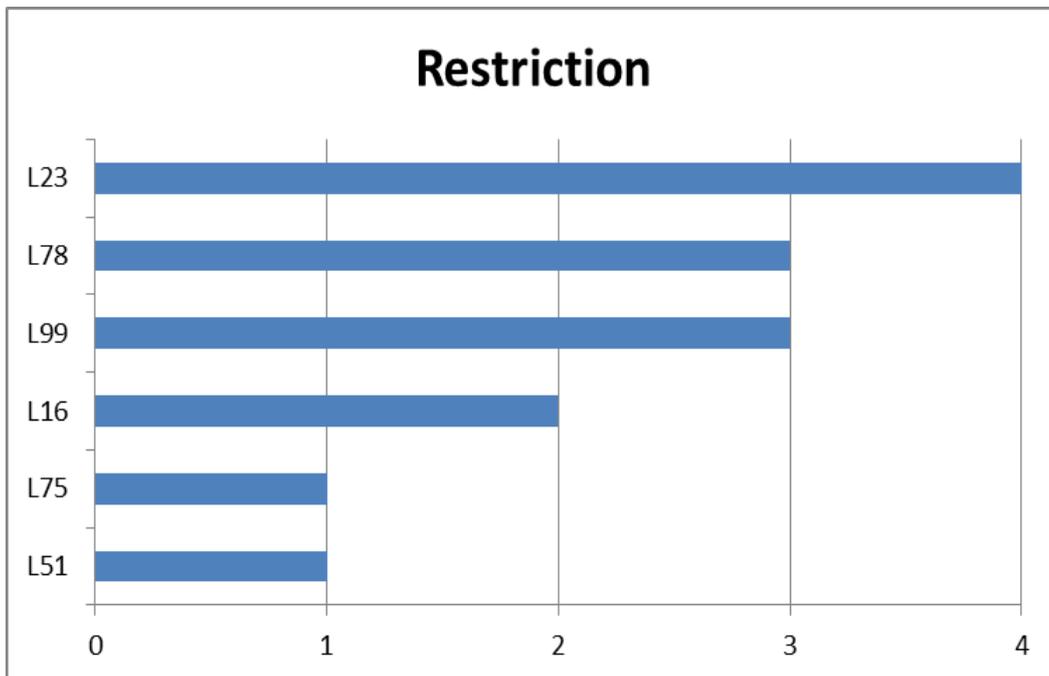


Figura 7. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro “*Restriction*”. Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 2,33.

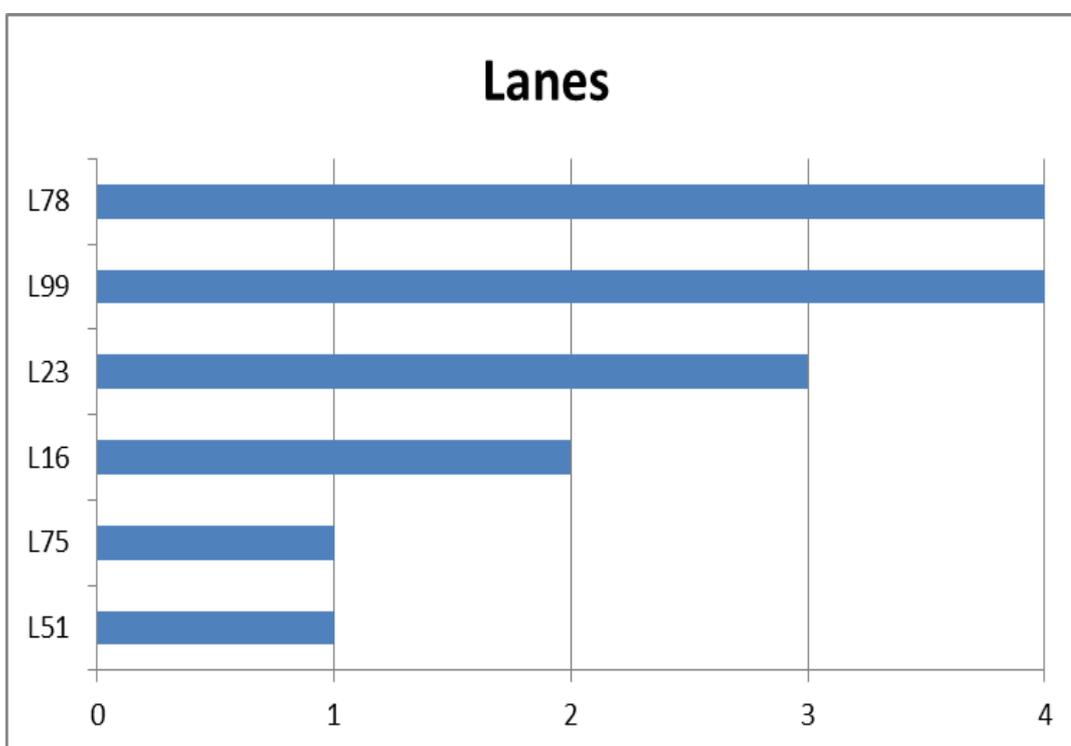


Figura 8. Punteggio ottenuto da ogni laboratorio per il parametro “*Lanes*”. Il valore medio ottenuto dai laboratori partecipanti per questo parametro è stato 2,5.

7. CONCLUSIONI

La tipizzazione molecolare di ceppi batterici mediante PFGE è una procedura di laboratorio complessa, in cui la qualità dei risultati può essere influenzata da diversi problemi. Il protocollo di laboratorio utilizzato in questo primo PT sulla tipizzazione di ceppi di *E. coli* è lo stesso utilizzato dalla rete di laboratori di riferimento ECDC per le infezioni umane e dalla rete internazionale PulseNet. Pertanto, la sua adozione rappresenta la chiave per armonizzare il database molecolare europeo per i ceppi VTEC isolati da alimenti e animali, che sarà gestito dall'EFSA, con i database di ECDC e PulseNet.

I sette parametri presi in considerazione nell'analisi dei profili prodotti nell'ambito del PT consentono una valutazione generale dei Laboratori partecipanti e, considerati singolarmente, rappresentano dei buoni indicatori dei punti critici per la produzione di profili PFGE che abbiano i requisiti necessari per l'inserimento in un unico database e la successiva comparazione.

I 6 Laboratori che hanno partecipato volontariamente a questo primo PT hanno risposto in maniera non uniforme, riportando valutazioni generali che andavano da "Insufficiente" (2 laboratori), a "Sufficiente" (2 laboratori), a "Buono" (2 laboratori).

La valutazione dei singoli parametri ha indicato che le fasi del protocollo di laboratorio in cui i Laboratori partecipanti dovranno migliorare la propria performance sono soprattutto quelle riguardanti la preparazione dei blocchetti, ovvero la determinazione della concentrazione di partenza delle cellule batteriche (*cell suspension*), la qualità delle bande nella corsa elettroforetica (*bands*), il grado di degradazione del DNA (*DNA degradation*). Ogni laboratorio partecipante ha ricevuto un proprio report individuale, contenente una valutazione dettagliata dei punti critici e un commento generale, con suggerimenti per migliorare la propria performance.

In conclusione, questo primo PT sulla tipizzazione molecolare di ceppi di *E. coli* mediante PFGE ha indicato che esiste una base di laboratori italiani coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti in grado di produrre profili PFGE di ceppi VTEC isolati da alimenti e animali, destinati ad alimentare il database molecolare che EFSA sta approntando. L'analisi dettagliata dei risultati ha anche permesso di definire i punti critici della procedura di laboratorio su cui i singoli laboratori potranno intervenire per migliorare la qualità dei profili prodotti, rendendoli compatibili con l'inserimento nel futuro database EFSA.