



EU Reference Laboratory for *E. coli*

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

Istituto Superiore di Sanità



Risultati del 2° studio inter-laboratorio (PT-PFGE2) per la 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

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. Sempre nel 2012, 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 strategia di questo sistema di sorveglianza molecolare è descritta nel documento della DG SANCO "*Vision paper on the development of data bases for molecular testing of foodborne pathogens in view of outbreak preparedness*", disponibile presso il sito web: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/vision-paper_en.pdf.

La raccolta di questi dati molecolari dovrebbe iniziare nel 2015, nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi previste dalla Direttiva CE 99/2003. La relativa banca dati sarà gestita dalla *European Food Safety Authority* (EFSA), che 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, coadiuvati dalle rispettive reti nazionali di laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, o Laboratori Ufficiali (LU).

Per garantire la qualità dei dati molecolari sui ceppi VTEC che saranno raccolti, l'EU-RL per *E. coli* ha istituito uno specifico programma di valutazione esterna di qualità (VEQ) sulla tipizzazione mediante PFGE per gli LNR. Un analogo programma viene condotto in parallelo in Italia dall'LNR per *E. coli* a beneficio dei LU. Questo programma nazionale di VEQ è stato avviato introducendo la PFGE nel 10° test inter-laboratorio (PT10) per l'identificazione e la tipizzazione dei VTEC. I risultati di questo primo studio inter-laboratorio (PT-PFGE1) sono disponibili sulla pagina web dell'LNR (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT_PFGE1.pdf).

Il secondo studio inter-laboratorio sulla PFGE (PT-PFGE2) è stato condotto sui ceppi di *E. coli* inviati ai LU nell'ambito dell'11° test inter-laboratorio sull'identificazione e tipizzazione dei VTEC (PT11). I risultati del PT-PFGE2 sono presentati in questo rapporto.

2. OBIETTIVI

Nell'ambito dell'obiettivo generale di mettere la rete italiana dei LU nelle condizioni di contribuire profili PFGE di elevata qualità alla futura banca dati EFSA sui ceppi VTEC di origine alimentare e animale, gli obiettivi specifici del PT-PFGE2 erano:

- Valutare il livello di preparazione della rete dei LU per la produzione di profili PFGE di alta qualità.
- Individuare gli aspetti della procedura di produzione e raccolta dei dati molecolari che richiedono interventi di miglioramento.

3. PARTECIPANTI

Hanno partecipato allo studio 5 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti ai 5 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 Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Rif. Reg. Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia

4. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto sui 6 ceppi di *E. coli* (campioni da 1 a 6) inviati ai LU nell'ambito dell'11° studio inter-laboratorio sull'identificazione e tipizzazione di ceppi di *E. coli* patogeni (PT11). I profili di PFGE dei ceppi test sono mostrati in Figura 1.

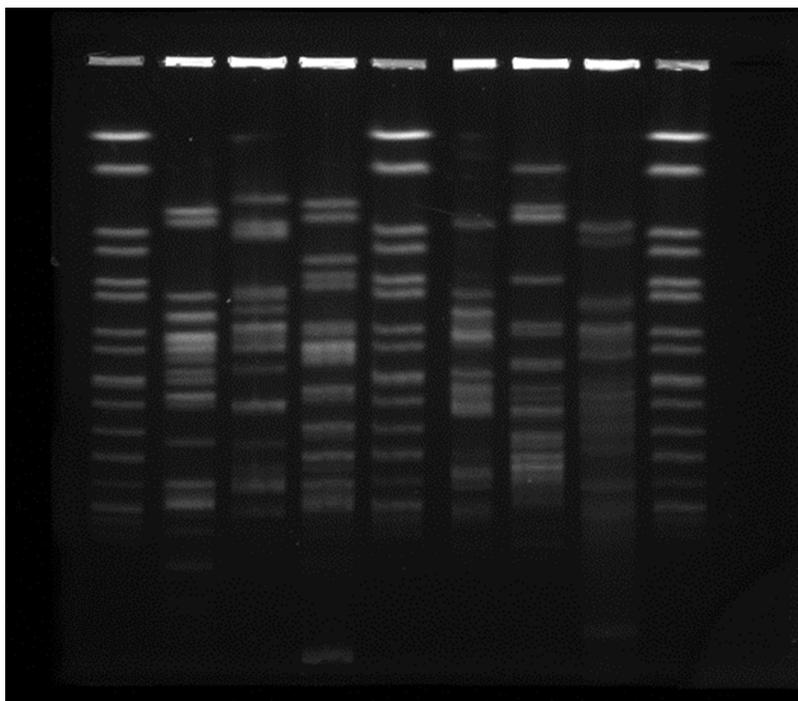


Figura 1. Profili di PFGE dei ceppi di E. coli inclusi nello studio. I pozzetti 1, 5 e 9 contengono il DNA ottenuto dal ceppo H9812 di *Salmonella enterica*, sierotipo Braenderup, che costituisce il marcatore di peso molecolare.

4.1. Preparazione dei campioni

La preparazione dei ceppi è descritta nel rapporto sui risultati del PT11, disponibile sulla pagina web dell'LNDR: (http://www.iss.it/binary/spva4/cont/Report_PT11_ITA.pdf). I ceppi (colture batteriche seminate per infissione in agar molle) sono stati inviati ai LU il 14 Giugno 2013.

4.2. Metodiche di laboratorio

Ai LU è stato richiesto di utilizzare la procedura: “*PFGE of E. coli O157:H7, E. coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri*”, in uso nel *PulseNet International Network*” (disponibile all'indirizzo URL:

http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf), e in particolare le condizioni di corsa specifiche per *E. coli* O157, prescindendo dal sierotipo dei ceppi test.

4.3. Raccolta e valutazione dei risultati

Le immagini dei gel PFGE sono state inviate tramite email come file in formato TIFF, insieme allo schema di caricamento dei campioni, allegato in formato Word o Excel. La qualità delle immagini è stata valutata secondo i criteri descritti nella “*Standard Operating Procedure for TIFF Quality Grading del PulseNet International Protocol (PNQ01)*”. Gli stessi criteri di valutazione sono stati finora adottati a livello europeo nell’ambito dei programmi di VEQ condotti dall’ECDC e dall’EU-RL VTEC.

Le prestazioni dei LU sono state analizzate assegnando una valutazione complessiva all’intera procedura e valutazioni specifiche a ogni parametro della procedura PFGE. Queste ultime sono state assegnate secondo i criteri descritti nella Tabella 1.

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]).

Per la valutazione complessiva sono state utilizzate le seguenti definizioni:

- “Insufficiente”: profili PFGE ritenuti non adatti per essere analizzati e utilizzati nella “*cluster analysis*”.
- “Sufficiente”: profili ritenuti utilizzabili per la comparazione, nonostante una qualità non elevata.
- “Buono”: profili con bande ritenute analizzabili tra la parte superiore del gel e la banda 33.3 Kb del marcatore di peso molecolare S. Braenderup H9812.
- “Eccellente”: profili con tutte le bande ben distinte e facilmente analizzabili.

Per ogni LU partecipante è stato inoltre preparato un report individuale con una valutazione critica e suggerimenti per superare eventuali problemi.

5. RISULTATI

Allo studio hanno partecipato 5 LU.

I giudizi complessivi assegnati a ogni Laboratorio per la capacità di produrre immagini di gel PFGE analizzabili e utilizzabili per la “*cluster analysis*” sono riportati in Figura 2.

Per uno dei laboratori la qualità delle immagini è stata ritenuta “insufficiente”.

Le valutazioni ottenute dai laboratori per i singoli parametri della procedura PFGE sono riportate nella Figura 3.

Il miglior risultato è stato ottenuto per il parametro “*Restriction*”, per il quale tutti i 5 laboratori hanno ottenuto la valutazione “Eccellente”. Al contrario, i maggiori problemi sono stati riscontrati per i parametri “*Bands*” e “*DNA degradation*”, per i quali rispettivamente 5 e 2 laboratori hanno riportato una valutazione “insufficiente”.

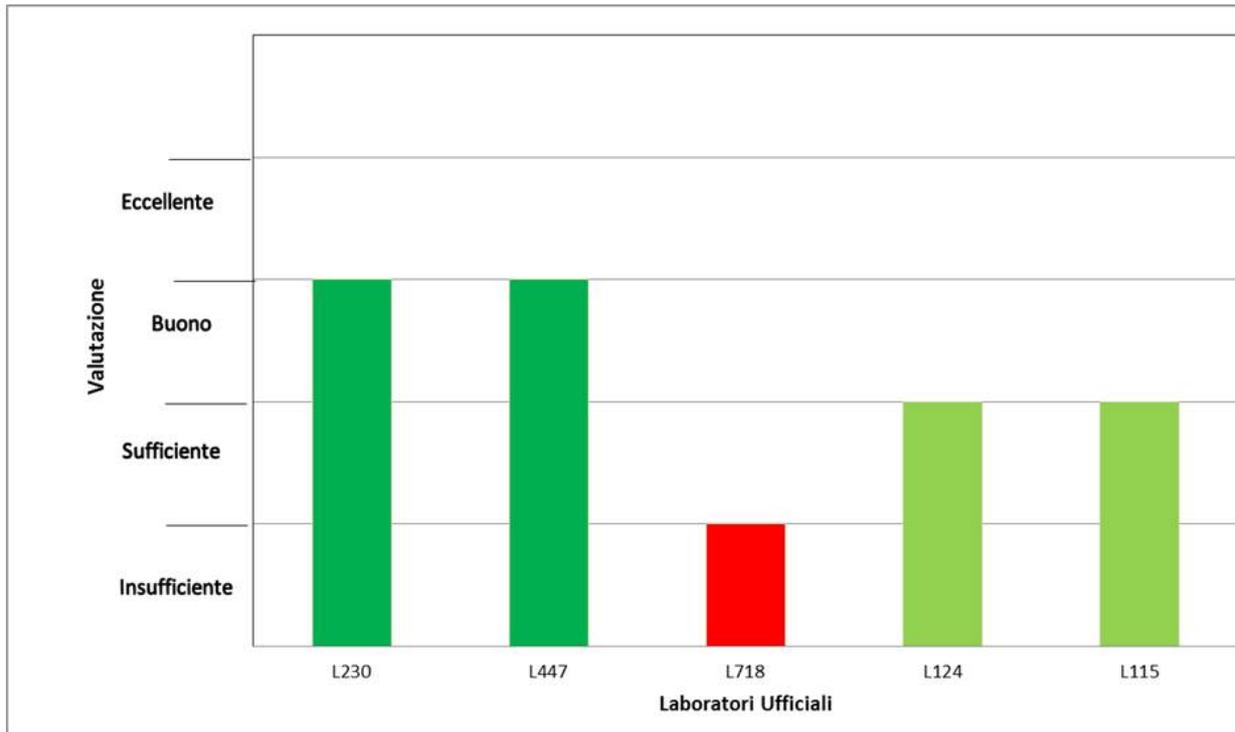


Figura 2. Valutazione complessiva della capacità di produrre immagini di gel PFGE utilizzabili per la “cluster analysis”. Le valutazioni sono state effettuate in base ai criteri descritti nel paragrafo 4.3.

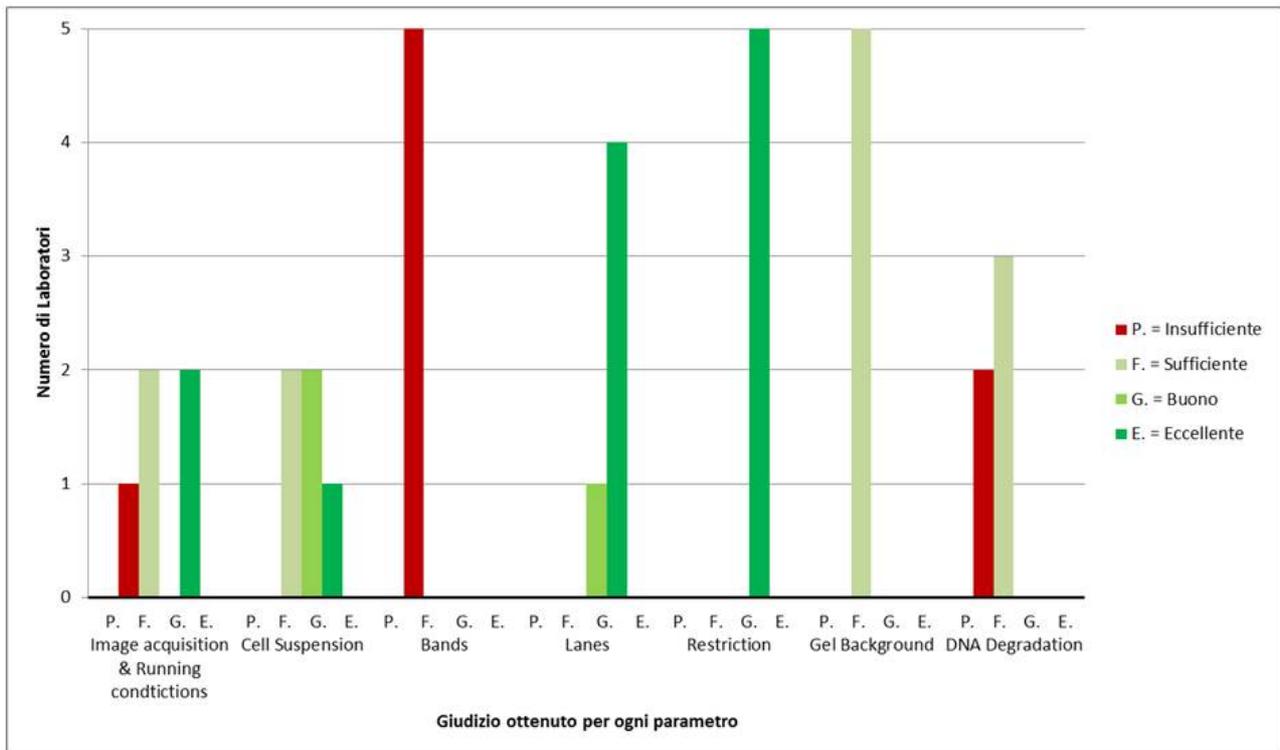


Figura 3. Valutazione dei singoli parametri della procedura PFGE. Le valutazioni sono state effettuate in base ai criteri descritti nel paragrafo 4.3 (Tabella 1).

6. CONCLUSIONI

Il presente studio inter-laboratorio sulla tipizzazione molecolare mediante PFGE è parte del programma di VEQ organizzato dalla rete dei Laboratori di Riferimento per *E. coli* (Reg. EC 882/2004) per preparare la raccolta dei dati di sorveglianza molecolare, che inizierà nel 2015, nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi coordinate dall'EFSA.

La PFGE è una procedura di laboratorio complessa, che richiede un elevato livello di standardizzazione per rendere i dati prodotti comparabili e utilizzabili per esercizi di “*cluster analysis*”. Il protocollo utilizzato nel programma di VEQ è quello da tempo utilizzato per i ceppi di VTEC O157 nell'ambito della rete internazionale *PulseNet* e, a partire dal 2012, dalla rete di laboratori di riferimento ECDC per i ceppi VTEC isolati da infezioni umane.

A questo secondo studio hanno partecipato cinque LU, quattro dei quali hanno prodotto immagini di gel PFGE ritenute almeno sufficienti per l'inserimento in un database di sorveglianza molecolare.

La valutazione dei singoli parametri della procedura PFGE ha indicato che quello che richiede maggiori sforzi di miglioramento è la qualità delle bande nella corsa elettroforetica (*bands*), per il quale tutti i laboratori hanno ottenuto una valutazione “insufficiente”, confermando l'andamento osservato nel primo PT, PT-PFGE1. Anche il grado di degradazione del DNA (*DNA degradation*) è ancora un parametro critico, con due LU che hanno riportato una valutazione “insufficiente”, anche se i risultati complessivi sono stati migliori rispetto a quelli ottenuti nell'ambito del PT-PFGE1. Miglioramenti rispetto al precedente PT si sono verificati per i parametri riguardanti la preparazione dei blocchetti (*cell suspension*), per cui nessun LU ha ottenuto una valutazione “insufficiente”, e soprattutto la restrizione del DNA (*restriction*), per cui tutti i laboratori hanno ottenuto una valutazione “eccellente”.

In conclusione, questo secondo PT sulla tipizzazione molecolare di ceppi di *E. coli* mediante PFGE ha confermato 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 che potranno alimentare il database molecolare che EFSA sta approntando.