



EU Reference Laboratory for *E. coli*

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

Istituto Superiore di Sanità



**Risultati del 3° studio inter-laboratorio (PT-PFGE2) per la
tipizzazione molecolare di ceppi di *Escherichia coli* mediante
*Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) – 2014***

Edited by: *Alfredo Caprioli, Clarissa Ferreri, Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Stefano Morabito,
Rosangela Tozzoli*

1. INTRODUZIONE

Nel 2012, la Commissione Europea (CE), DG SANCO, ha deciso di organizzare la raccolta di profili molecolari di ceppi di Salmonella, *L. monocytogenes* e VTEC isolati da alimenti e da animali, per integrare le attività di sorveglianza molecolare condotte dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sulle infezioni umane sostenute dalle stesse specie batteriche, nell'ambito del programma di sorveglianza "*Foodborne and waterborne diseases and zoonoses* (FWD)".

La strategia di questo sistema di sorveglianza molecolare, volto ad aumentare il livello di preparazione nei confronti dei focolai epidemici di origine alimentare, 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 dei dati molecolari dovrebbe iniziare alla fine del 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.

Per garantire la qualità dei dati molecolari riferiti ai 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 i LNR. Un analogo programma viene condotto in parallelo in Italia dall'LNR per *E. coli* a beneficio dei Laboratori ufficiali. Questo programma nazionale di VEQ è stato avviato introducendo la PFGE negli ultimi tre studi interlaboratorio (PT10, PT11 e PT13) per l'identificazione e la tipizzazione dei VTEC. I risultati dei primi due studi (PT-PFGE1 e PT-PFGE2) sono disponibili sulla pagina web dell'LNR (<http://www.iss.it/coli>). I risultati del terzo (PT-PFGE3) sono presentati in questo rapporto.

2. OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO

L'obiettivo generale è quello di mettere la rete italiana dei Laboratori ufficiali 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-PFGE3 sono stati:

- Valutare il livello di preparazione della rete dei Laboratori ufficiali rispetto alla produzione di profili PFGE di qualità sufficiente a consentire l’inserimento nel database di profili molecolari che EFSA sta costituendo.
- Individuare gli aspetti della procedura di produzione e raccolta dei dati molecolari che richiedono interventi di miglioramento.

Lo studio è stato condotto seguendo le prescrizioni dello standard internazionale ISO/IEC 17043:2010 “*Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*”, estendendo alla PFGE la tipizzazione dei ceppi di *E. coli* oggetto del 13° test inter-laboratorio per l’identificazione e la tipizzazione di ceppi di *E. coli* patogeni (PT13, report disponibile alla pagina web del LNR *E. coli* (<http://www.iss.it/coli>)).

3. PARTECIPANTI

Hanno partecipato allo studio sei Laboratori ufficiali, afferenti a 5 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS):

- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Batteriologia/ Laboratorio Regionale di Riferimento per Enterobatteri Patogeni, Teramo
- 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 Riferimento Regionale Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I campioni oggetto dello studio erano 7 ceppi di *E. coli* (campioni da 1 a 7), inviati ai Laboratori nell’ambito del 13° studio inter-laboratorio sull’identificazione e tipizzazione di ceppi di *E. coli* patogeni (PT13). La preparazione dei campioni è descritta nel report sui risultati del PT13, disponibile sulla pagina web dell’LNR: <http://www.iss.it/coli>. I profili di PFGE dei ceppi test sono mostrati in Figura 1 e sono stati considerati come profili di riferimento per valutare quelli presentati dai Laboratori. I ceppi (colture batteriche seminate per infissione in agar molle) sono stati inviati ai Laboratori il 14 Giugno 2013.

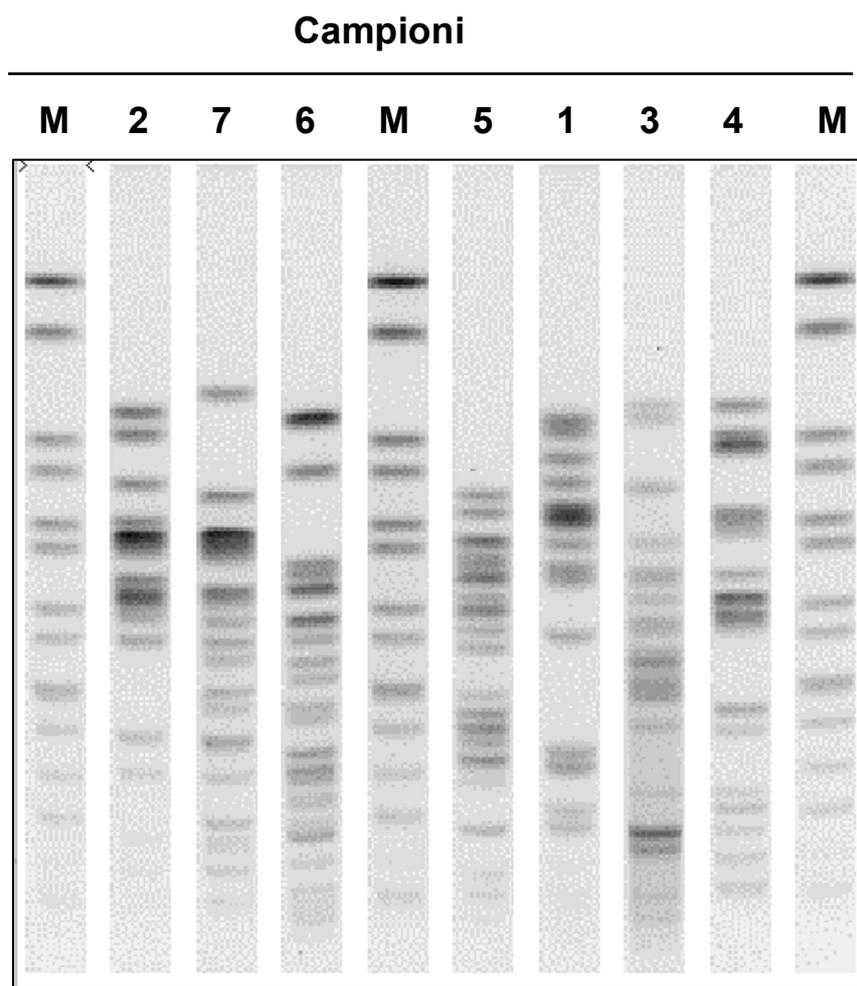


Figura 1. Profili di PFGE dei ceppi di *E. coli* inclusi nello studio. Il numero di ogni campione corrisponde a quello dei ceppi inviati nell'ambito del PT13. I pozzetti indicati con M contengono il DNA ottenuto dal ceppo H9812 di *Salmonella enterica*, sierotipo Braenderup, che costituisce il marcatore di peso molecolare.

4.2. Metodiche di laboratorio

Ai Laboratori 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). In particolare, è stato richiesto ai Laboratori di utilizzare le condizioni di corsa specifiche per *E. coli* O157:H7, prescindendo dal sierotipo dei ceppi test.

4.3. Raccolta dei risultati

Le immagini dei gel PFGE sono state inviate come file in formato TIFF tramite posta

elettronica, insieme allo schema di caricamento dei campioni, allegato in formato Word o Excel.

4.4. Analisi dei risultati: valutazione visiva delle immagini dei gel

Le immagini dei gel sono state sottoposte a valutazione visiva, allo scopo di verificarne l'idoneità per la successiva analisi computerizzata. I criteri per la valutazione erano i seguenti:

- La posizione del gel nell'immagine: l'intero gel deve essere visibile, inclusi i pozzetti e le ultime bande, fino al margine inferiore del gel.
- La corretta identificazione dei campioni, mediante abbinamento con i codici assegnati ad ogni laboratorio.
- Il corretto posizionamento dello standard *S. braenderup* H9812 nei pozzetti 1, 5, 10 (gel da 10 pozzetti) o 1, 5, 10, 15 (gel da 15 pozzetti). La corretta posizione dello standard è importante, poiché facilita il confronto dei profili PFGE da gel differenti.
- La messa a fuoco dell'immagine del gel, senza sovraesposizione delle bande.
- La posizione della banda a più basso peso molecolare dello standard, che deve trovarsi a 1 – 1,5 cm dal bordo inferiore del gel.
- L'intensità delle bande, che deve essere approssimativamente la stessa in ogni pozzetto.
- L'assenza di DNA non digerito.
- Le bande dovrebbero essere ben definite e distinte in ogni parte del gel; un certo grado di distorsione può essere accettato, ma non deve interferire con la successiva analisi computerizzata.
- Lo sfondo del gel deve essere limpido.
- Non deve essere presente degradazione del DNA.
- La risoluzione dell'immagine deve avere un valore di profondità di immagine di 8 bit.

4.5. Analisi computerizzata dei profili PFGE: analisi della distorsione della migrazione

Le immagini dei gel che hanno superato positivamente la valutazione visiva sono state sottoposte ad analisi computerizzata mediante il software BioNumerics, seguendo le procedure operative standard per l'interpretazione e la valutazione dei profili di PFGE pubblicate dall'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>). Il primo parametro considerato è stato la "distorsione della migrazione", che tiene conto del grado di distorsione che i profili sottoposti ad analisi subiscono quando vengono comparati con quelli di riferimento utilizzati come standard. Quando viene applicata l'opzione "*Distortion*

bar” del software BioNumerics, il livello di allungamento di ogni *lane* è visualizzato come una barra colorata, come mostrato in Figura 2. I colori chiari (azzurro o giallo) indicano un livello di distorsione accettabile (Figura 2, Pannello A). I colori più scuri (rosso o blu intenso) indicano una distorsione più marcata, che può tuttavia essere compensata dal software (Figura 2, Pannello B). Una colorazione nera indica distorsioni troppo forti per essere compensate dal software (Figura 2, Pannello C). I profili sottoposti a questa analisi sono stati considerati idonei per la successiva *cluster* analisi quando, nella fase di normalizzazione, le barre di distorsione mostravano colori chiari (Figura 2, Pannelli A e B), mentre sono stati considerati non idonei quando mostravano colore nero (Figura 2, Pannello C). Per questi ultimi, pertanto, la *cluster* analisi non è stata eseguita.

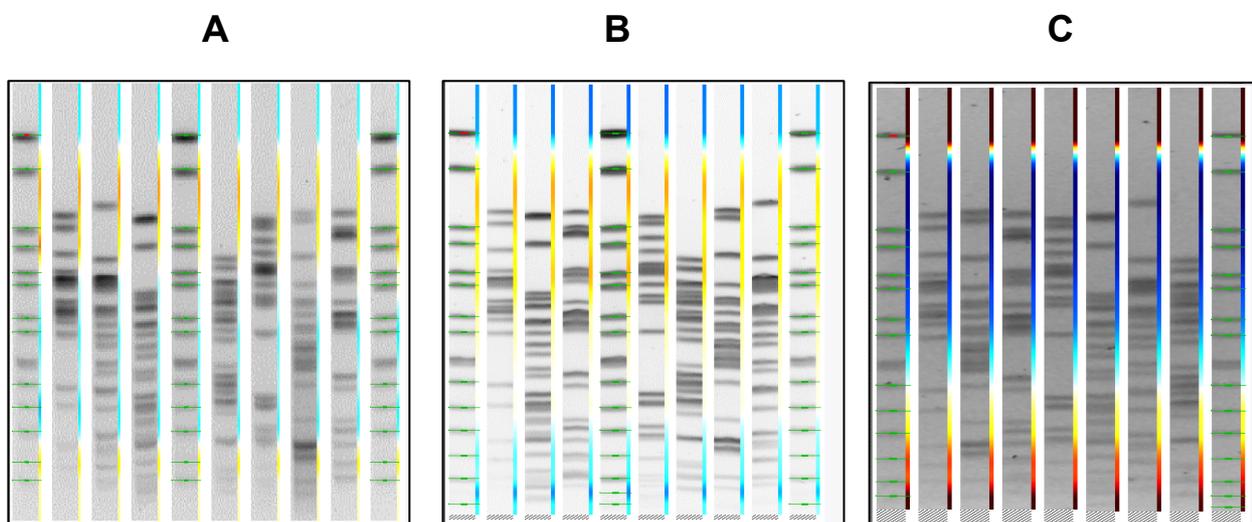


Figura 2. Esempi di analisi della “distorsione della migrazione”. Quadro A: colori chiari, indice di un basso livello di distorsione. Quadro B: colori più scuri, indice di un livello di distorsione più forte, ma ancora accettabile. Quadro C: colore nero, indice di un elevato e non accettabile livello di distorsione.

4.6. Analisi computerizzata dei profili PFGE: *cluster* analisi

Le immagini dei gel che sono state considerate accettabili dopo analisi della distorsione della migrazione sono state analizzate per l’assegnazione delle bande e la *cluster* analisi, utilizzando i profili PFGE prodotti dall’LNR (Figura 1) come riferimento.

La similarità tra i profili in esame e quelli di riferimento è stata calcolata usando il coefficiente “*Dice*”, che dipende dal numero di bande comuni ai due profili, applicando parametri di ottimizzazione e tolleranza fissati al valore di 1,5%. I profili sono stati considerati accettabili per l’inclusione in un database quando la *cluster* analisi riportava un

valore di similarità maggiore o uguale a 97%. I profili che davano un valore inferiore a 97% sono stati considerati “non accettabili”.

4.7. Valutazione della *prestazione* dei Laboratori

La capacità dei Laboratori di produrre profili PFGE di qualità tale da consentirne l’inserimento in un database di profili molecolari è stata valutata come:

Insufficiente: Quando più di quattro dei sette profili non sono stati accettati.

Sufficiente: Quando tre o quattro dei sette profili non sono stati accettati.

Buona: Quando uno o due dei sette profili non sono stati accettati.

Eccellente: Quando tutti i sette profili sono stati accettati.

Ogni Laboratorio ha ricevuto una relazione individuale con la valutazione della propria prestazione, un esame critico dell’immagine del gel e suggerimenti per migliorarne la qualità.

5. RISULTATI

Lo studio è stato condotto da sei Laboratori. Le sei immagini di gel PFGE presentate sono state tutte considerate analizzabili alla valutazione visiva (paragrafo 4.4). Alla successiva analisi computerizzata per la valutazione della distorsione della migrazione (paragrafo 4.5), una delle immagini è stata considerata non analizzabile. I 35 profili rimanenti sono stati quindi sottoposti a *cluster* analisi per determinarne il livello di similarità con i corrispondenti profili di riferimento (paragrafo 4.6). Nel complesso, su un totale di 42 profili PFGE presentati, 28 (66,6 %) hanno mostrato un valore di similarità maggiore o uguale a 97% e sono stati quindi considerati accettabili per l’inclusione in un data-base (Figura 3).

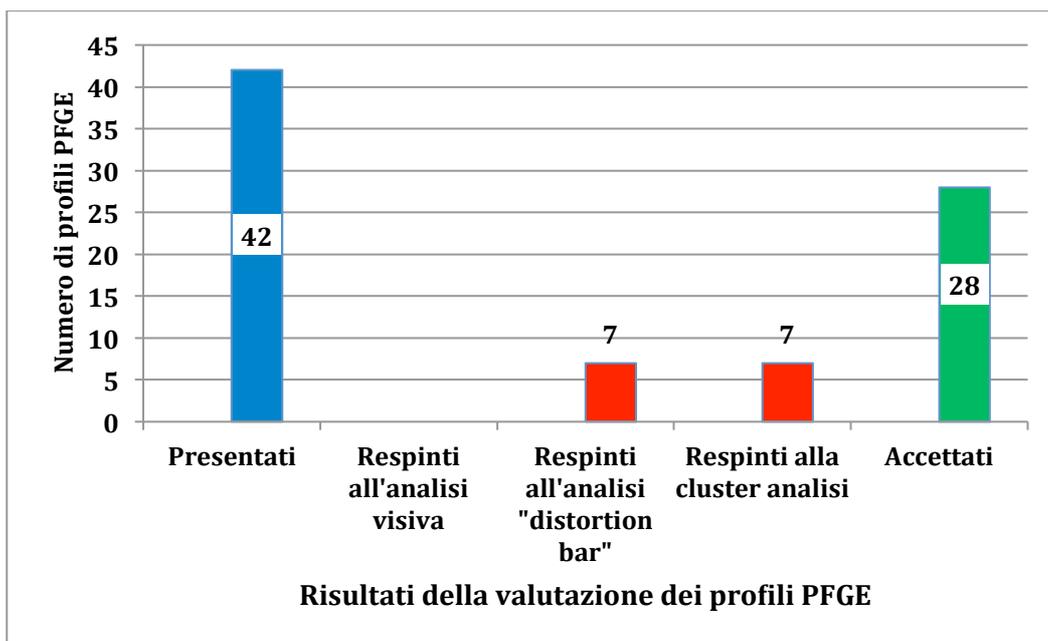


Figura 3. Valutazione dei profili PFGE ricevuti.

I valori di similarità ottenuti attraverso la *cluster* analisi con i corrispondenti profili PFGE di riferimento sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Cluster analisi dei profili PFGE presentati dai Laboratori con i corrispondenti profili di riferimento. I profili sono stati considerati accettabili per valori di similarità maggiori o uguali al 97% rispetto a quelli di riferimento. Le celle colorate in verde indicano i profili accettati, quelle in rosso i profili non accettati. I numeri nelle celle indicano i valori di similarità. NA: non analizzabile (la qualità del profilo è stata ritenuta non idonea per la *cluster* analisi).

Lab	Valore di similarità (%) dei profili PFGE presentati dai Laboratori con i corrispondenti profili di riferimento:						
	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7
L235	100	100	100	100	97,4	100	100
L250	100	100	100	100	100	100	100
L508	93,8	96,3	100	100	100	87,2	100
L707	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
L904	97,0	96,6	97,1	97,1	94,7	97,8	94,1
L991	100	100	100	100	100	95,5	100

Cinque Laboratori hanno presentato profili PFGE ritenuti accettabili, mentre un Laboratorio ha presentato un'immagine che è stata ritenuta non analizzabile per l'eccessiva distorsione della migrazione subita nella fase di normalizzazione del gel.

Il numero dei profili ritenuti accettabili inviati da ogni Laboratorio è riportato in Figura 4. Due Laboratori hanno inviato immagini di gel in cui tutti i sette i profili sono stati ritenuti accettabili.

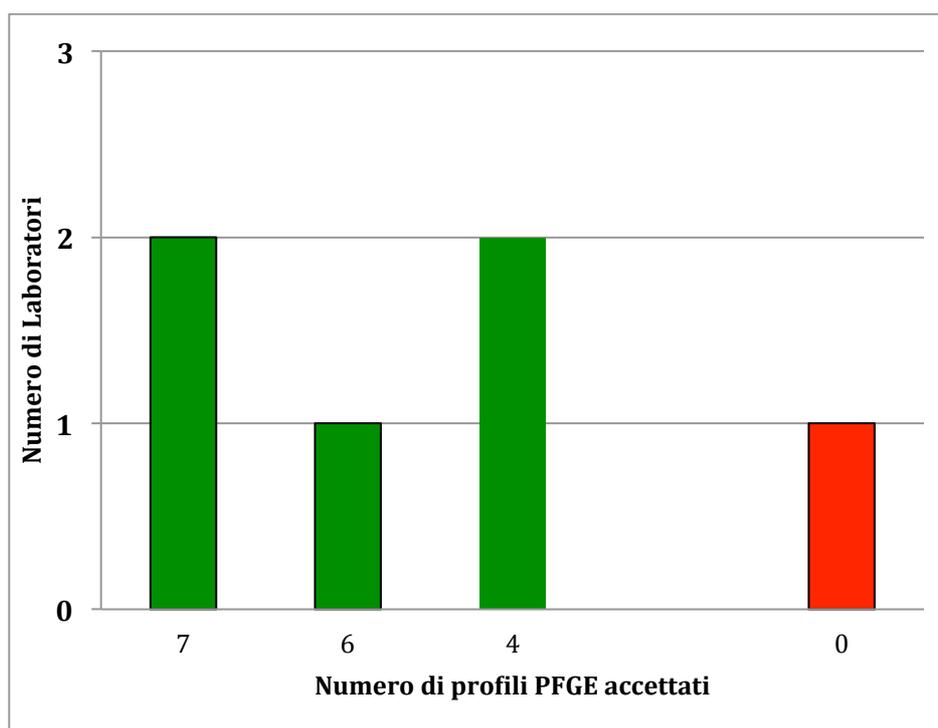


Figura 4. Numero di profili PFGE ritenuti accettabili per numero di Laboratori. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui prestazione è stata considerata insufficiente.

La *prestazione* di ogni laboratorio è stata valutata utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.7, sulla base del numero di profili PFGE ritenuti accettabili per l'inclusione in un data-base di profili molecolari. La valutazione ottenuta da ogni Laboratorio è riportata in Figura 5.

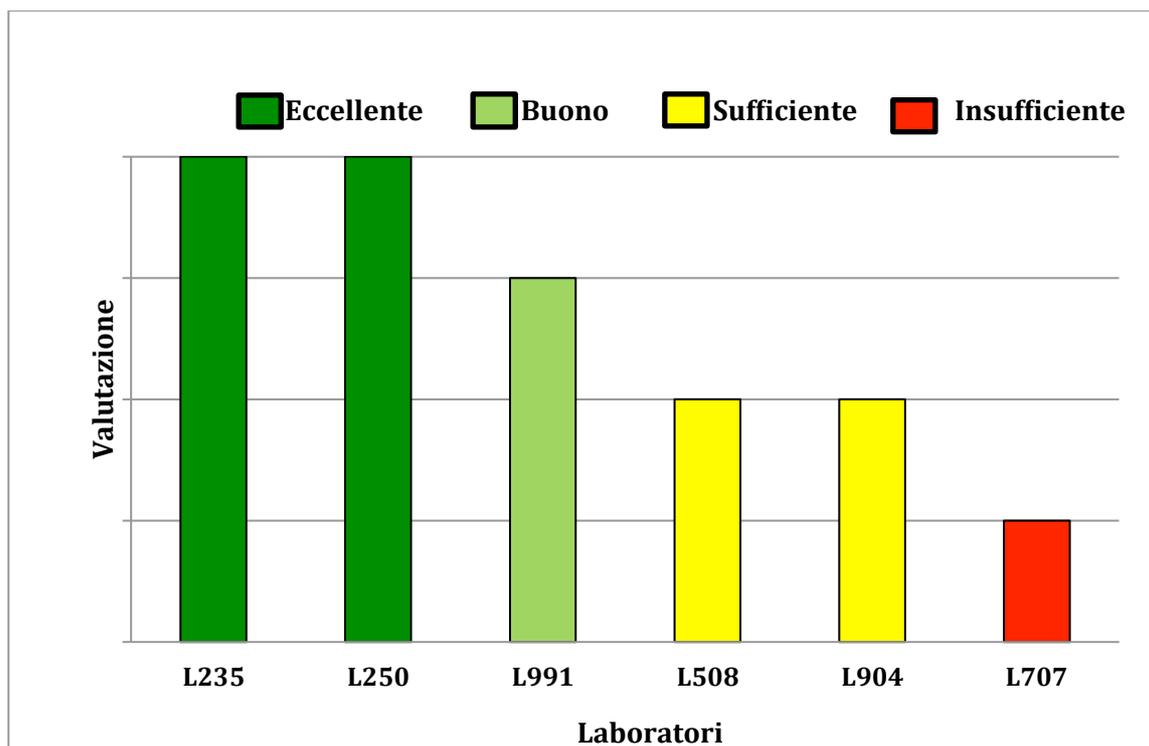


Figura 5. Valutazione della prestazione dei laboratori. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui prestazione è stata considerata insufficiente.

Le problematiche tecniche riscontrate analizzando le immagini dei gel sono riportate in Figura 6, suddivise per tipologia.

Per tutti i Laboratori sono state riscontrate problematiche relative alla presenza di bande compresse e diffuse nella parte centrale del gel e al processo di acquisizione dell'immagine, sia per la messa a fuoco delle bande che per la presenza di residui di colorante.

Per quattro laboratori sono state riscontrate problematiche relative alla non uniforme intensità delle bande, indice di una insufficiente standardizzazione delle sospensioni batteriche. Questa è una problematica rilevante, in quanto un'intensità troppo elevata può pregiudicare la corretta identificazione di bande molto ravvicinate, mentre una intensità troppo bassa potrebbe nascondere la presenza di bande nel profilo di restrizione.

Ogni laboratorio ha ricevuto una relazione individuale, con commenti specifici e indicazioni per risolvere le problematiche riscontrate.

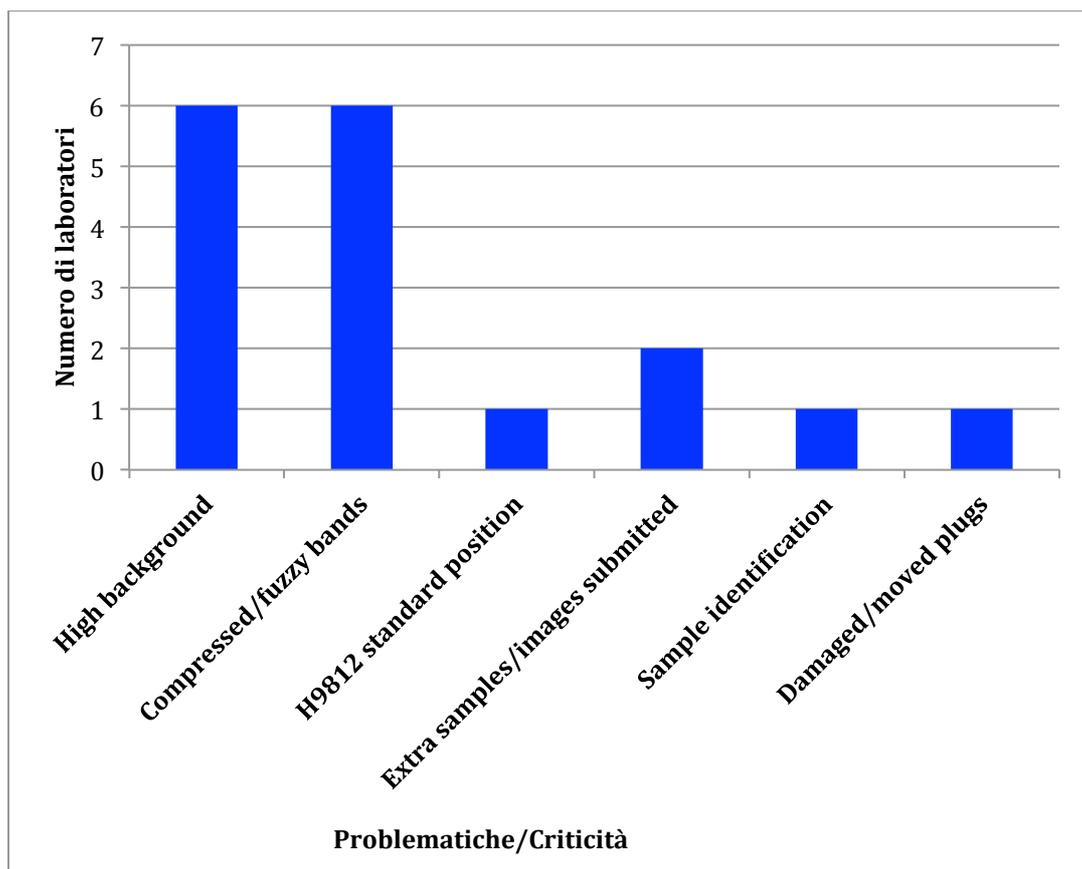


Figura 6. Problematiche tecniche più frequentemente riscontrate analizzando le immagini dei profili PFGE.

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 si svolgerà nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi coordinate dall'EFSA.

A questo terzo studio hanno partecipato sei Laboratori, cinque dei quali hanno presentato immagini di gel PFGE ritenute accettabili per l'inserimento in un database di sorveglianza molecolare, sulla base delle procedure recentemente pubblicate da EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>).

Per due di questi Laboratori, tutti i profili presentati sono stati ritenuti accettabili, e la loro prestazione è stata valutata eccellente. All'opposto, un Laboratorio non ha presentato profili ritenuti accettabili e la sua prestazione è stata valutata come insufficiente.

In conclusione, questo studio ha confermato che esiste una piattaforma di laboratori italiani coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti in grado di produrre profili PFGE di ceppi VTEC

isolati da alimenti e animali di qualità sufficiente ad alimentare il database molecolare che EFSA sta approntando.