



EU Reference Laboratory for *E. coli*

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

Istituto Superiore di Sanità



Risultati del 4° studio inter-laboratorio (PT-PFGE4) per la tipizzazione molecolare di ceppi di *Escherichia coli* mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) – 2015

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

1. INTRODUZIONE

Nel 2012, la Commissione Europea (CE), DG SANTE, 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 SANTE "*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 avverrà 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 SANTE, 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 gli 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 di questi studi (PT-PFGE1, PT-PFGE2 e PT-PFGE3) sono disponibili sulla pagina web dell'LNR (<http://www.iss.it/coli>). I risultati del quarto studio (PT-PFGE4) 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 banca dati EFSA sui ceppi VTEC di origine alimentare e animale. Gli obiettivi specifici del PT-PFGE4 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.

Inoltre, lo studio ha consentito una prima valutazione della capacità dei laboratori ufficiali di condurre un’analisi computerizzata dei profili di PFGE prodotti utilizzando il software *BioNumerics*.

Lo studio è stato condotto seguendo le prescrizioni dello standard internazionale ISO/IEC 17043:2010 “*Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*”.

3. PARTECIPANTI

Hanno partecipato allo studio sette Laboratori ufficiali, afferenti a 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS):

- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Laboratorio Regionale di Riferimento per Enterobatteri Patogeni, Teramo
- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Riferimento Regionale Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- 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 costituiti da 10 ceppi di *E. coli* (campioni da 1 a 10) seminati per infissione in agar molle. I campioni sono stati preparati l’8 e il 9 Aprile 2015 e sono stati inviati ai partecipanti il 20 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 genetiche dei ceppi batterici oggetto di studio. L’omogeneità dei campioni è stata verificata secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010.

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.

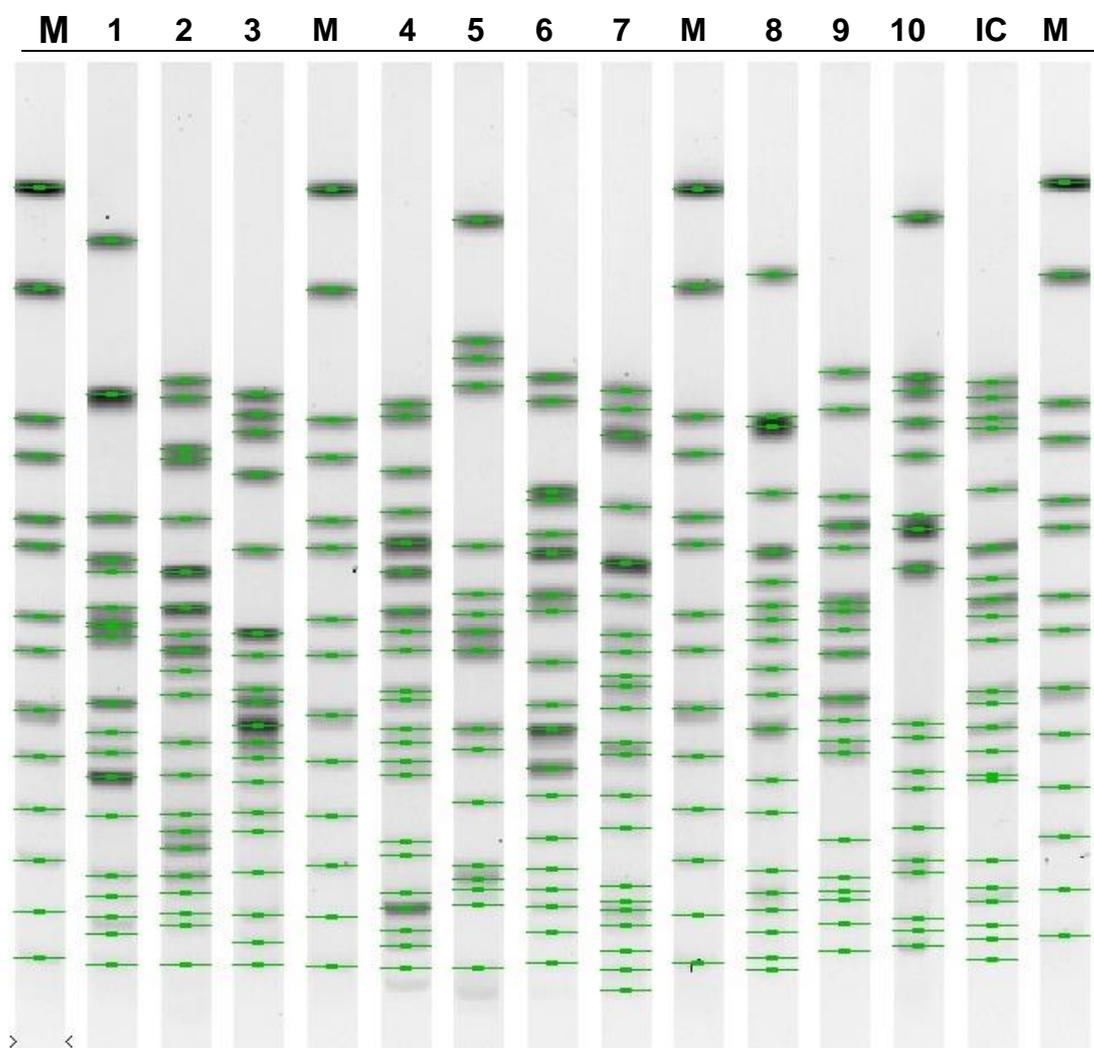


Figura 1. Profili di PFGE dei ceppi di *E. coli* inclusi nello studio. I pozzetti indicati con M contengono il DNA ottenuto dal ceppo H9812 di *Salmonella enterica*, sierotipo Braenderup, che costituisce il marcatore di peso molecolare.

4.2. Metodi di analisi

4.2.1. PFGE

Ai Laboratori è stato richiesto di utilizzare la procedura per la produzione di profili PFGE recentemente pubblicata dall'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>), che consiste in un adattamento della procedura PNL05 per *E. coli*,

Salmonella, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* in uso nel *PulseNet International Network* (PulseNet International, 2013). 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.

4.2.2. Analisi mediante BioNumerics software

Ai laboratori disponibili a condurre questa parte dello studio è stato richiesto di utilizzare la procedura per l'interpretazione e la cura dei profili pubblicata dall'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>).

4.3. Raccolta dei risultati

I laboratori hanno ricevuto una procedura dettagliata per l'invio dei risultati. In breve, i laboratori che non hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* hanno inviato le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, insieme allo schema di caricamento dei campioni e a dettagli tecnici sul protocollo utilizzato, 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*.

I Laboratori che hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* hanno inviato i profili PFGE dei ceppi analizzati, compresa la normalizzazione e l'assegnazione delle bande. I file inviati erano in formato XML, generati dal *BioNumerics* e comprendevano anche il caricamento dei campioni, le informazioni richieste e l'immagine del gel in formato TIFF.

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 pari a 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.

Per i Laboratori che hanno inviato solo le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, questa analisi è stata effettuata dall'LNR.

Per i Laboratori che hanno effettuato l'analisi *BioNumerics*, l'LNR ha esaminato direttamente i file XML inviati. Quando sono stati riscontrati problemi (es. nella selezione dell'area dell'immagine, nell'assegnazione delle bande dello standard *S. braenderup* H9812, nella sottrazione del background), l'analisi è stata ripetuta dall'LNR.

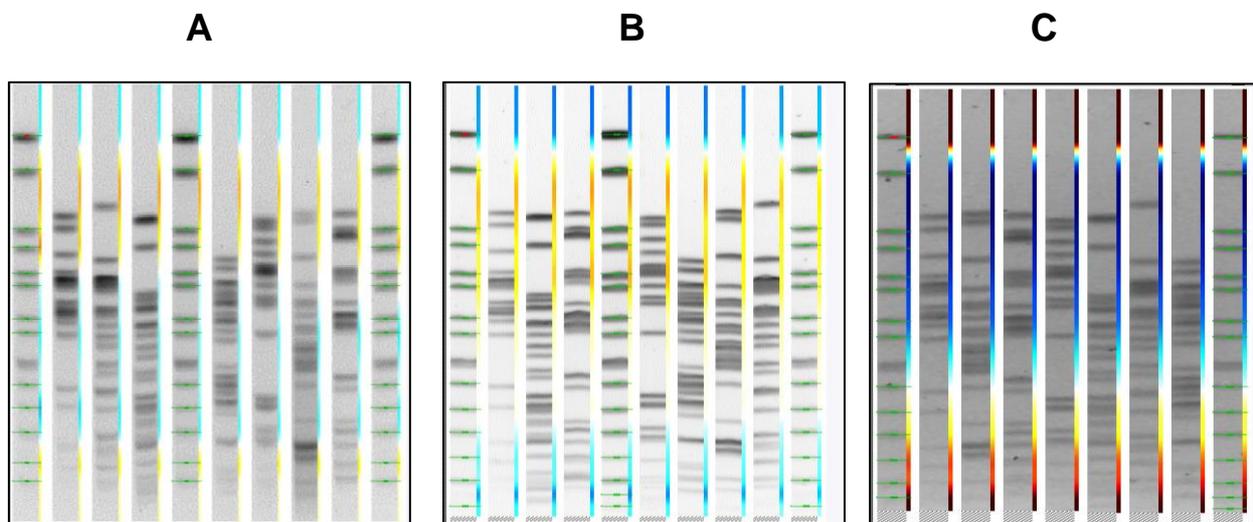


Figura 2. Esempi di analisi della “distorsione della migrazione”. Quadro A: colori chiari, indice di un basso livello di distorsione. Quadro B: colori più scuri, indice di un livello di distorsione più forte, ma ancora accettabile. Quadro C: colore nero, indice di un elevato e non accettabile livello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

Per i laboratori che hanno inviato solo le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, la normalizzazione, l'assegnazione delle bande e la *cluster* analisi sono state effettuate dall'LNR.

Per i laboratori che hanno effettuato l'analisi *BioNumerics*, l'assegnazione delle bande effettuata dal Laboratorio partecipante è stata utilizzata per la *cluster* analisi. Per i profili per cui la *cluster* analisi mostrava errori nell'assegnazione delle bande, la *cluster* analisi è stata ripetuta dall'LNR prima di valutare la prestazione del laboratorio.

4.7. Valutazione della prestazione dei laboratori

4.7.1. Valutazione dei profili PFGE

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:

- **Eccellente:** Quando tutti i profili presentati sono stati accettati.
- **Buona:** Quando meno del 30 % dei profili non sono stati accettati.
- **Sufficiente:** quando tra il 30 % e il 60 % dei profili sono stati accettati.
- **Insufficiente:** Quando più del 60 % dei profili non sono stati accettati.

4.7.2. Valutazione della capacità di condurre l'analisi BioNumerics

La capacità di condurre correttamente l'analisi *BioNumerics* è stata valutata per i Laboratori che hanno inviato file XML, che sono stati suddivisi in categorie da A ad E secondo i seguenti criteri:

- **A:** L'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio non richiedeva modifiche.
- **B:** L'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio richiedeva solo modifiche minori.
- **C:** L'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio richiedeva modifiche sostanziali o doveva essere completamente ripetuta.
- **D:** Era necessario ripetere sia l'assegnazione delle bande che la normalizzazione.
- **E:** I file XML non erano utilizzabili per la *cluster* analisi.

4.7.3. Relazioni individuali

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 sette Laboratori: 4 hanno inviato solo l'immagine del gel PFGE come file TIFF mentre 3 hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* ed inviato i file XML.

5.1. Valutazione dei profili PFGE

Sei delle sette immagini di gel PFGE presentate sono state considerate analizzabili alla valutazione visiva (paragrafo 4.4), mentre una (presentata dal laboratorio L952) non è stata considerata idonea. Alla successiva analisi computerizzata per la valutazione della distorsione della migrazione (paragrafo 4.5), le sei immagini, sono risultate idonee per l'analisi. Un totale di 60 profili è stato quindi sottoposto alla *cluster* analisi per determinarne il livello di similarità con i corrispondenti profili di riferimento (paragrafo 4.6). Nel complesso, 51 profili PFGE, su un totale di 70 inviati (73 %), 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).

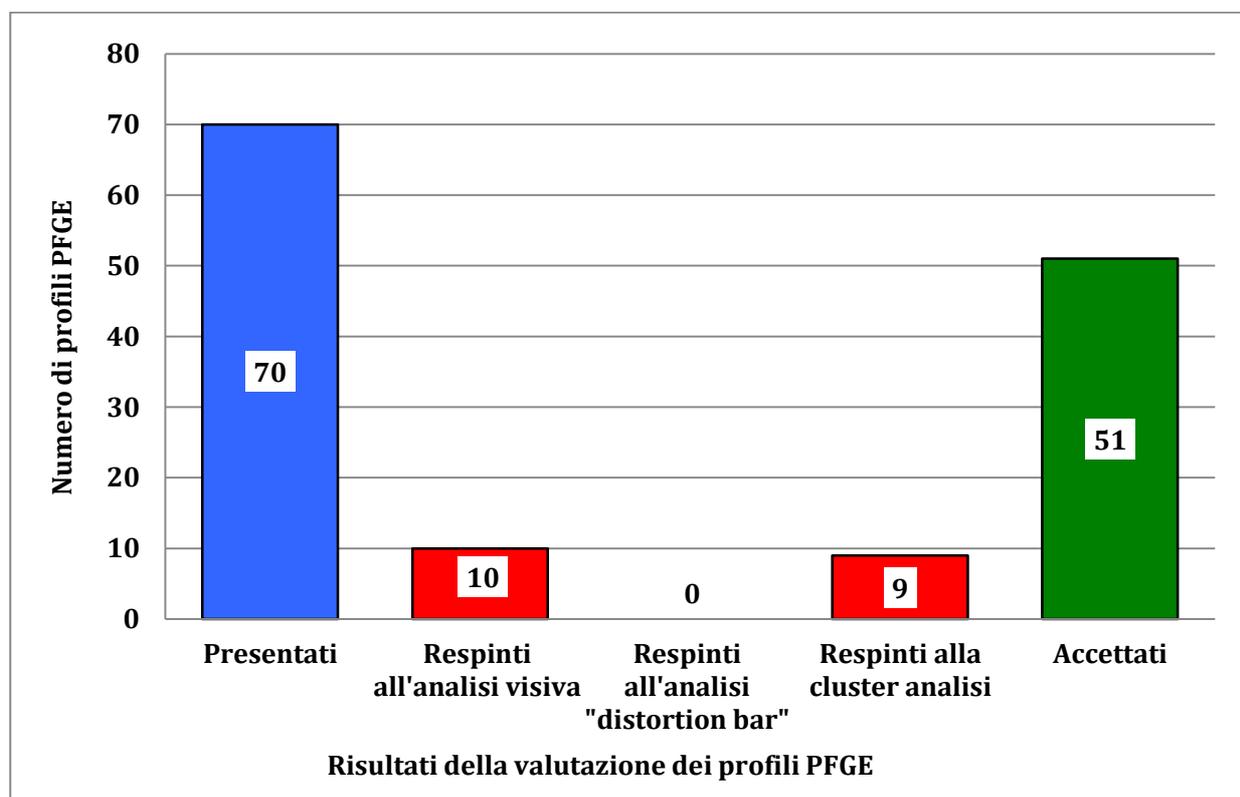


Figura 3. Valutazione dei profili PFGE ricevuti.

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 ritenuti accettabili, quelle in rosso i profili ritenuti non accettabili. 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 prodotti dall'LNR:									
	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
L551	97.3	100	100	100	100	100	97.7	100	97.4	97.1
L660	94.4	97.6	97.3	97.7	93.8	100	97.7	97.4	97.3	97.1
L756	97.3	100	100	97.8	97.0	97.4	97.7	97.4	97.3	97.1
L836	100	100	100	100	100	97.3	97.7	100	100	97.1
L885	94.4	86.5	94.4	90.0	97.0	97.3	90.5	100	89.1	90.9
L896	97.3	97.6	100	97.7	97.0	100	97.7	97.4	97.3	97.1
L952	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Sei Laboratori hanno presentato profili PFGE ritenuti accettabili e per quattro di loro tutti i 10 profili inviati sono stati ritenuti accettabili. Il numero di profili accettati inviati da ogni Laboratorio è riportato in Figura 4.

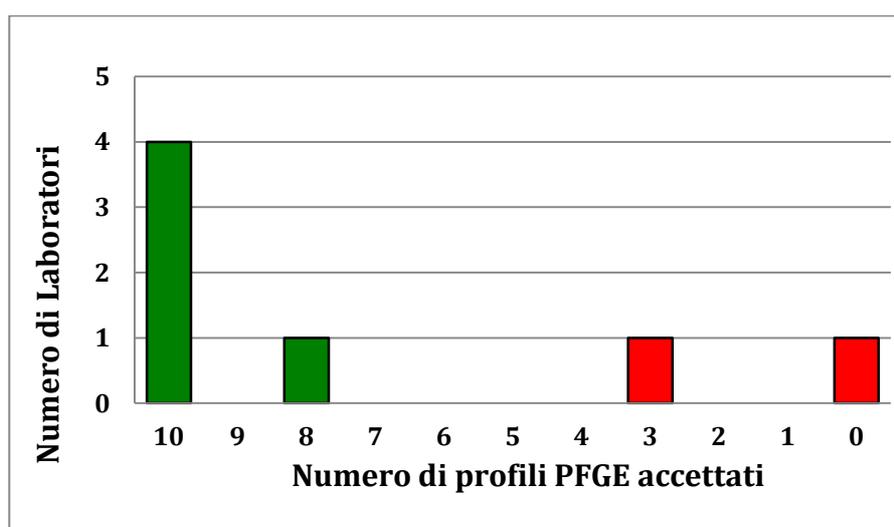


Figura 4. Numero di profili PFGE ritenuti accettabili per numero di Laboratori. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui prestazione è stata considerata insufficiente.

La prestazione di ogni laboratorio è stata valutata utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.7.1, sulla base del numero di profili PFGE ritenuti accettabili per l'inclusione in un database di profili molecolari. La valutazione ottenuta dai Laboratori è riportata in Figura 5.

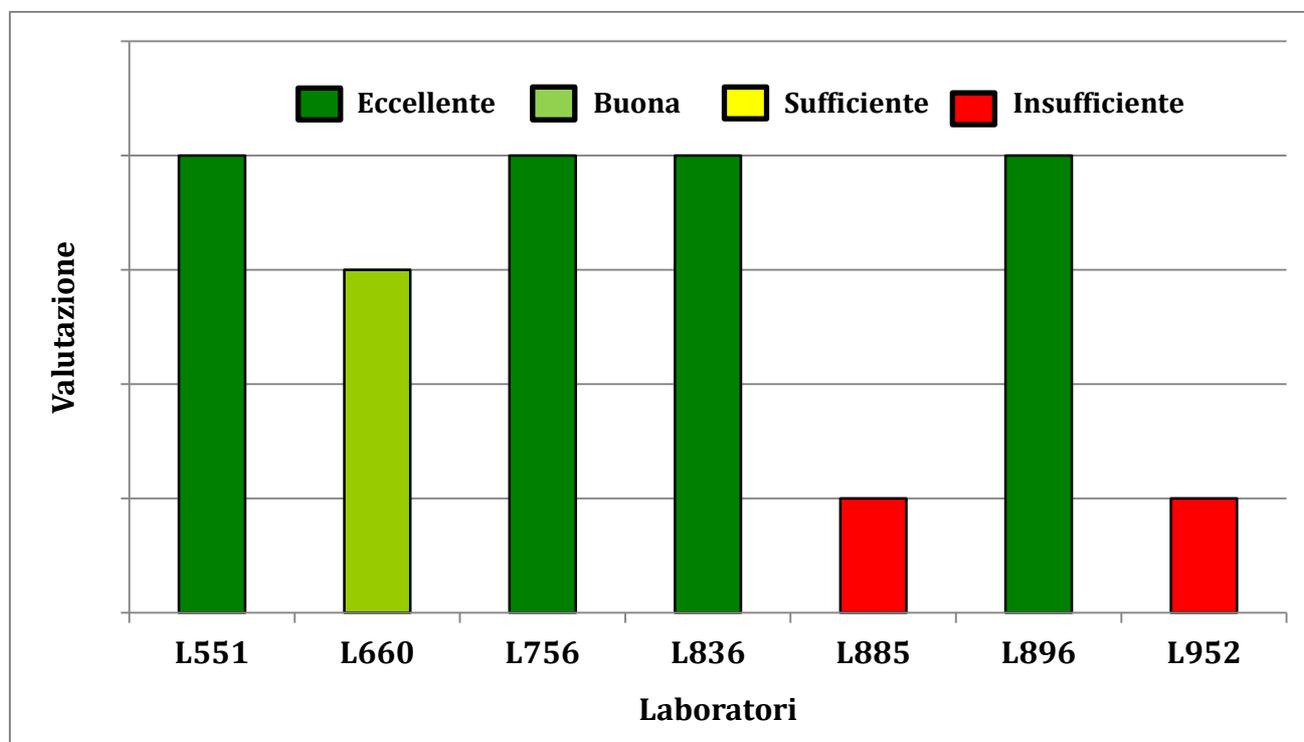


Figura 5. Valutazione della prestazione dei laboratori. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui prestazione è stata considerata insufficiente.

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

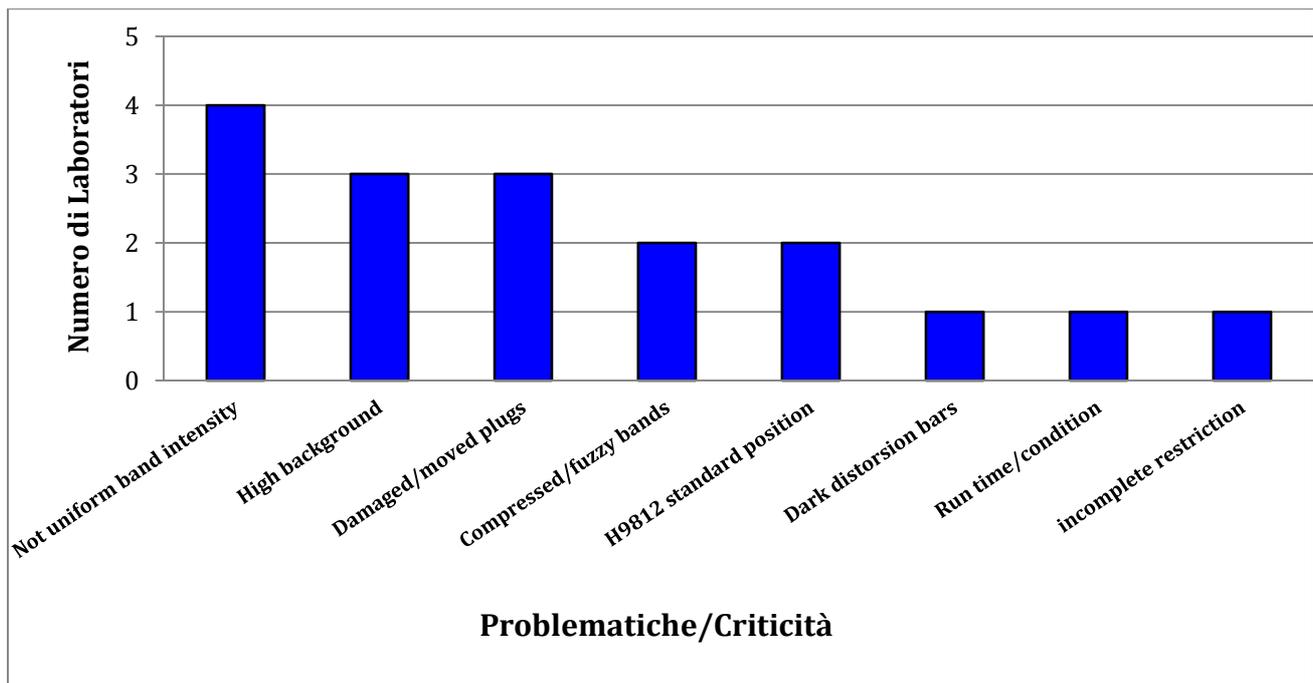


Figura 6. Problematiche tecniche più frequentemente riscontrate analizzando le immagini dei profili PFGE.

5.2. Valutazione della capacità dei laboratori di condurre l'analisi *BioNumerics*

La capacità dei laboratori di condurre l'analisi *BioNumerics* è stata valutata analizzando i file XML inviati e verificando che il laboratorio fosse in grado di importare correttamente i file per impostare il data-base in locale e analizzare i profili secondo le indicazioni inviate dall'LNR. I tre laboratori che hanno condotto l'analisi sono stati quindi categorizzati secondo i criteri descritti nel paragrafo 4.7.2. Il laboratorio L756 rientrava nella categoria C, il laboratorio L885 nella categoria D e il laboratorio L896 nella categoria E, in quanto il file XML presentato non è risultato utilizzabile per la cluster analisi.

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 quarto studio hanno partecipato sette Laboratori, sei 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 quattro di questi Laboratori, tutti i profili presentati sono stati ritenuti accettabili, e la loro prestazione è stata valutata eccellente. Un Laboratorio non ha presentato profili ritenuti accettabili e un altro solo tre profili, e la prestazione di questi due laboratori è stata valutata come insufficiente.

Lo studio ha anche consentito di effettuare una prima valutazione della capacità dei laboratori di analizzare i profili PFGE prodotti utilizzando il software *BioNumerics*. L'analisi è stata condotta da tre laboratori, solo uno dei quali ha mostrato una buona capacità di analisi.

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.