



**Risultati del primo studio inter-laboratorio nazionale  
sull'identificazione della presenza di ceppi di *Escherichia coli* produttori  
di Shiga tossina (STEC) in campioni clinici - 2022**

**A cura di:**

*Eleonora Ventola, Paola Chiani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Guendalina Fornari Luswergh, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli, Stefano Morabito*



## INTRODUZIONE

Questo primo studio inter-laboratorio è stato organizzato nell'ambito del progetto afferente al programma CCM 2019 dal titolo "Azioni mirate a ridurre l'impatto di salute delle infezioni da *E. coli* produttore di Shiga tossina (STEC) nella popolazione pediatrica ed a supporto dei programmi di controllo One-Health del rischio epidemico da STEC" che ha tra gli obiettivi il miglioramento dell'efficacia della sorveglianza clinica ed epidemiologica delle infezioni da STEC nella popolazione pediatrica.

Questo documento descrive lo studio e ne rappresenta la valutazione.

## STRUTTURA E OBIETTIVI DELLO STUDIO

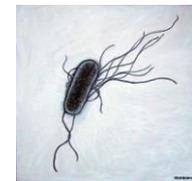
Questo studio inter-laboratorio è stato organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *Escherichia coli* dell'Istituto Superiore di Sanità con l'obiettivo di valutare la capacità dei laboratori clinici diagnostici in Italia di identificare la presenza di STEC in campioni di feci, utilizzando i metodi in uso nelle loro routine diagnostiche. In aggiunta, il LNR per *E. coli* ha messo a disposizione delle procedure diagnostiche basate sull'amplificazione dei principali geni di virulenza dei ceppi STEC mediante PCR convenzionale o Real Time.

Lo studio ha previsto l'analisi da parte dei laboratori partecipanti di due campioni di feci, di cui uno positivo per STEC.

## PARTECIPANTI

La raccolta delle adesioni allo studio inter-laboratorio è avvenuta mediante la compilazione di un *form* online. In totale, hanno partecipato allo studio 11 laboratori clinici di strutture ospedaliere o a tutela della salute, di seguito elencati nel dettaglio:

- Azienda Ospedaliero - Universitaria A. Meyer, Dipartimento Specialistico Interdisciplinare, SOSA Centro Regionale Toscano per la Fibrosi Cistica, Firenze
- Ospedali Riuniti, Ancona
- Università degli Studi di Bari - Dipartimento Interdisciplinare di Medicina
- Ospedale Santobono - UOC Patologia Clinica, Napoli
- Comprensorio Sanitario di Bolzano, Laboratorio Aziendale di Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria dell'Alto Adige



- Città della Salute e della Scienza di Torino, S.C Microbiologia e Virologia, Torino
- IRCCS Policlinico di S. Orsola Azienda Ospedaliero-Universitaria, Unità operativa: Microbiologia, Bologna
- Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma
- Azienda Sanitaria Universitaria Giuliano Isontina ASUGI, S.C. Microbiologia e Virologia, Trieste
- Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, UOC Microbiologia, Verona
- Azienda Ospedaliera Annunziata, Laboratorio di Microbiologia, Cosenza

## MATERIALI E METODI

### Preparazione dei campioni

I campioni utilizzati nello studio inter-laboratorio erano stati precedentemente analizzati presso il LNR per *E. coli* nel corso delle attività di routine per la diagnosi di infezione da STEC.

Il campione 1 era naturalmente contaminato con un ceppo STEC di sierogruppo O26, isolato e caratterizzato presso il LNR. La tabella sottostante riporta le caratteristiche dei due campioni fecali inviati ai partecipanti:

	<b>Caratteristiche del campione e del ceppo STEC presente nel campione</b>
Campione 1	Campione positivo per STEC: ceppo <i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; O26
Campione 2	Campione negativo per STEC

I due campioni sono stati sottoposti nuovamente al saggio diagnostico presso il LNR per la verifica delle caratteristiche attese nei giorni 19-21 Settembre 2022 e 26-28 Settembre 2022. Una piccola quantità dei campioni fecali è stata prelevata in asepsi con un'ansa sterile da 10 µl e inserita in criotubi da 2 ml identificati con codici numerici assegnati casualmente a ciascun campione e diversi per ogni laboratorio. I tubi così marcati sono poi stati trasferiti in contenitori di sicurezza e spediti in condizioni di refrigerazione tramite corriere il 26 Settembre 2022. Ai Laboratori è stata data l'indicazione di iniziare le analisi nel più breve tempo possibile.



## Raccolta dei risultati

I risultati sono stati raccolti attraverso un formulario online. Ai laboratori è stato richiesto di indicare il proprio codice di laboratorio (Lab code), fornito in anticipo a ciascuno dei partecipanti, le informazioni sulla data di arrivo, e lo stato di conservazione dei campioni, nonché i risultati ottenuti per ciascun campione.

## Valutazione della performance dei Laboratori

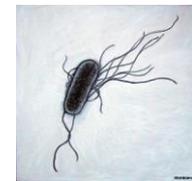
Al fine di valutare la competenza dei laboratori partecipanti nell'identificare campioni di feci contaminati con STEC, è stato applicato un approccio di assegnazione di penalità per ogni risultato non corretto riportato. La somma dei punti di penalità assegnati ha generato un punteggio totale con una soglia di quattro punti, al di sopra i cui la *performance* è stata valutata come non soddisfacente. Nel dettaglio, sono stati assegnati quattro punti di penalità per ogni risultato errato relativamente alla presenza dei geni di virulenza *stx1* e *stx2*, codificanti le Shiga tossine. Due punti di penalità sono stati assegnati ai risultati non corretti relativamente all'identificazione del gene *eae*, un gene chiave per il particolare meccanismo di adesione noto come *Attaching and Effacing*. Ai fini della valutazione, in questo studio non è stato considerato l'isolamento del ceppo STEC.

Ai Laboratori che hanno utilizzato metodi non in grado di discriminare tra *stx1* e *stx2* non è stato attribuito un punteggio di penalità.

## RISULTATI

I campioni sono stati ricevuti in buone condizioni da tutti i partecipanti tra il 26 e il 29 Settembre. Tutti i laboratori partecipanti hanno applicato metodiche basate sulla PCR per l'analisi dei campioni.

Tre laboratori hanno indicato che il metodo utilizzato era basato sul sistema di PCR multiplex FILMARRAY™ (pannello gastroenterico), due dei quali, PTCU\_006 e PTCU\_008, hanno impiegato in parallelo anche un altro sistema ciascuno, il metodo immunocromatografico *SHIGA TOXIN QUIK CHEK*™ e il metodo Allplex™ Gastrointestinal Panel Assay, basato anch'esso su una PCR multiplex, rispettivamente. Altri tre Laboratori hanno dichiarato di utilizzare metodiche non in grado di discriminare tra i geni *stx1* e *stx2*.



La tabella sottostante riporta i risultati inviati dai laboratori partecipanti, unitamente ai punti di penalità assegnati:

	<b>Campione 1: Risultato atteso Campione positivo per STEC, <i>eae; stx1; stx2; O26</i></b>	<b>Campione 2: Risultato atteso Campione negativo per STEC, geni di virulenza assenti</b>	<b>Punti di penalità</b>
<b>Lab_code</b>	<b>Risultato inviato</b>	<b>Risultato inviato</b>	
Lab_PTCU_001	Campione negativo per STEC	Campione negativo per STEC	8
Lab_PTCU_002	Campione negativo per STEC	Campione negativo per STEC	8
Lab_PTCU_003	<i>eae</i>	Campione negativo per STEC	8
Lab_PTCU_004	<i>stx1; stx2</i>	Campione negativo per STEC	2
Lab_PTCU_005	<i>stx2; eae</i>	Campione negativo per STEC	4
Lab_PTCU_006	Campione positivo per STEC *	Campione negativo per STEC	--
Lab_PTCU_007	Campione positivo per STEC *	Campione negativo per STEC	--
Lab_PTCU_008	Campione positivo per STEC *	Campione negativo per STEC	--
Lab_PTCU_009	Campione positivo per STEC *	Campione negativo per STEC	--
Lab_PTCU_010	Campione positivo per STEC *	Campione negativo per STEC	--
Lab_PTCU_011	Campione positivo per STEC*	Campione negativo per STEC	--

\* Il metodo utilizzato non discrimina tra *stx1* e *stx2*

## CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI FINALI

Questo rappresenta il primo studio inter-laboratorio eseguito in Italia per valutare le *performance* analitiche dei laboratori diagnostici degli Ospedali Pediatrici per la diagnosi di infezioni da STEC.

Il LNR per *E. coli*, organizzatore dello studio, ha suggerito una procedura analitica da seguire per l'esecuzione delle analisi, lasciando tuttavia la possibilità ai laboratori di utilizzare altre metodiche in uso nella loro routine diagnostica.



L'analisi dei risultati permette di trarre le seguenti considerazioni finali:

1. Undici Laboratori diagnostici afferenti a strutture di diverse regioni italiane hanno aderito allo studio indicando una capacità diagnostica per STEC presente sul territorio.
2. I risultati dello studio hanno mostrato una buona capacità diagnostica per la maggior parte dei Laboratori partecipanti. In particolare, solo tre Laboratori hanno ottenuto un totale di punti di penalità superiore a 4, indicando una performance non soddisfacente.
3. In generale è stata evidenziata la mancanza di ricerca o di rilevazione del gene *eae* per la maggior parte dei Laboratori. Questo risultato, tuttavia, non rappresenta una criticità rilevante, in quanto, dal punto di vista della diagnosi di infezione da STEC, è di primaria importanza la rilevazione dei geni codificanti le Shiga tossine.
4. Sei Laboratori hanno utilizzato metodiche non in grado di discriminare tra i geni *stx1* e *stx2* essendo tuttavia in grado di identificare correttamente la presenza di un ceppo STEC nel campione 1 e l'assenza nel campione 2. Considerando la descritta associazione tra la presenza dei geni codificanti la Shiga tossina di tipo 2 (Stx2) e le forme più gravi di infezione, si ritiene che l'utilizzo di reagenti in grado di discriminare almeno tra i due tipi principali (Stx1 ed Stx2) debba essere preferito in quanto questa informazione potrebbe essere utilizzata per indirizzare il trattamento dell'infezione.
5. Nessuno dei laboratori partecipanti ha tentato l'isolamento del ceppo STEC dal campione 1. Questa procedura, anche se non ha impatto diretto sulla diagnosi d'infezione, permette di studiare le caratteristiche di virulenza dei ceppi STEC isolati dai casi di infezione nell'uomo e rappresenta il mezzo per l'analisi comparativa con i ceppi STEC isolati dai sospetti veicoli di infezione. È pertanto essenziale che i campioni dei pazienti positivi per la presenza di STEC vengano sottoposti ad isolamento, presso il Laboratorio diagnostico o inviati al LNR, per la successiva caratterizzazione molecolare.