



**Risultati dell'11° test inter-laboratorio (PT11) per l'identificazione  
e la tipizzazione di ceppi di *Escherichia coli* produttori di  
verocitotossina (VTEC) e appartenenti ad altri gruppi di *E. coli*  
patogeni - 2013**

**A cura di:**

*Susan Babsa, Alfredo Caprioli, Clarissa Ferreri, Fabio Galati, Maria Luisa Marziano, Antonella Maugliani,  
Fabio Minelli, Stefano Morabito, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli*

## 1. INTRODUZIONE

Negli anni scorsi, il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato cinque test inter-laboratorio (PT1, PT2, PT5, PT6 e PT10) per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC).

Nel 2013, l'11° test inter-laboratorio (PT11) ha riguardato l'identificazione di ceppi VTEC ma anche di ceppi appartenenti ad altri gruppi di *E. coli* patogeni, quali: *E. coli* Enteroaggregativi (EAaggEC), *E. coli* Enterotossigenici (ETEC), *E. coli* Enteropatogeni, (EPEC), *E. coli* Enteroinvasivi (EIEC). Questi pato-gruppi di *E. coli* costituiscono una causa importante di diarrea del viaggiatore ma sono anche stati riportati come causa di casi sporadici ed episodi epidemici di origine alimentare nei paesi industrializzati.

In questo rapporto sono presentati e valutati i risultati relativi alla ricerca e alla tipizzazione dei geni virulenza e quelli relativi alla tipizzazione sierologica. I risultati della tipizzazione molecolare mediante PFGE saranno presentati in un rapporto separato.

Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Europeo di Riferimento (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 report di quello studio è disponibile al sito web dell'EU-RL ([http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report\\_PT11\\_5.pdf](http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT11_5.pdf)).

## 2. PARTECIPANTI

Al PT hanno aderito 11 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti e delle malattie animali, afferenti a 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Laboratorio Regionale di Riferimento per gli Enterobatteri Patogeni, Teramo
- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZSLER, Reparto Microbiologia, Brescia
- IZS Lazio e Toscana, Direzione Operativa Diagnostica Generale, Roma
- IZS Lazio e Toscana, Direzione Operativa Controllo degli Alimenti, Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Mezzogiorno, Sezione di Salerno, UO Microbiologia Alimentare, Fuorni (SA)
- 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
- IZS Umbria e Marche, Sezione di Fermo, Laboratorio Controllo Alimenti, Fermo (FM)

- IZS Venezia, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN).

### 3. OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

Lo studio aveva i seguenti obiettivi:

1. L'identificazione dei ceppi VTEC mediante la ricerca dei loro principali geni di virulenza: *vtx1 group*, *vtx2 group* ed *eae*.
2. L'identificazione del sierogruppo dei ceppi VTEC ed EPEC.
3. La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx1* e *vtx2*, utilizzando il protocollo di PCR sperimentato nell'ambito del PT10.
4. L'identificazione dei ceppi appartenenti ai pato-gruppi EAggEC, ETEC, EPEC ed EIEC mediante ricerca dei geni di virulenza che ne rappresentano il *target* diagnostico.
5. Una seconda valutazione esterna di qualità sulla tipizzazione molecolare dei ceppi mediante PFGE. I risultati di quest'ultima parte dello studio saranno presentati in un report separato.

Lo studio, condotto secondo quanto prescritto dalla norma ISO/IEC 17043:2010 "Conformity assessment – General requirements for proficiency testing", era articolato in tre parti:

1. L'identificazione dei pato-gruppi di *E. coli* attraverso l'amplificazione dei rispettivi geni *target* di virulenza, effettuata con la tecnica della Real Time PCR. I geni di virulenza ricercati erano:
  - I geni *vtx1* gruppo, *vtx2* gruppo ed *eae* (intimina) per i VTEC.
  - Il gene *eae* per gli EPEC.
  - I geni *aaiC* e *aggR*, coinvolti nell'adesione entero-aggregativa, per gli EAggEC.
  - I geni *lt*, *sth*, and *stp*, codificanti le enterotossine termolabile e termostabile, per gli ETEC.
  - Il gene *ipaH*, coinvolto nell' invasione della mucosa intestinale, per gli EIEC.
2. La tipizzazione sierologica dei ceppi VTEC ed EPEC, identificando i ceppi appartenenti ai 12 sierogruppi più frequentemente coinvolti nelle infezioni umane, in Europa: O26, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O146, O157.
3. La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* identificati.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1. Preparazione dei campioni

Il campione oggetto di analisi era costituito da sei ceppi di *E. coli* (campioni 1-6), selezionati tra quelli della collezione batterica dell' EU-RL VTEC e controllati per i caratteri genetici e fenotipici oggetto dello studio.

Le caratteristiche dei ceppi sono riportate nella Tabella 1 e sono state considerate come "valori reali" (*gold standard*).

**Tabella 1. Caratteristiche dei ceppi di *E. coli* utilizzati nello studio**

Ceppo	Pato-gruppo	Siero-gruppo	Gene di virulenza ( <i>subtype</i> )								
			<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaIC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>
1	ETEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	VTEC	O113	+ ( <i>vtx1c</i> )	+ ( <i>vtx2b</i> )	-	-	-	-	-	-	-
3	EIEC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	VTEC	O121	-	+ ( <i>vtx2a</i> )	+	-	-	-	-	-	-
5	EPEC	O26	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	EAggEC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

I campioni erano costituiti da colture batteriche seminate in fiale *microbank* per la conservazione dei ceppi batterici e sono stati identificati con codici numerici a tre cifre assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio. I campioni sono stati preparati il 14 Giugno e inviati ai partecipanti il 17 Giugno.

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 oggetto dello studio. L'omogeneità dei campioni è stata verificata secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010.

## 4.2. Metodi di laboratorio

L'identificazione dei pato-gruppi di *E. coli* è stata effettuata mediante amplificazione dei rispettivi geni *target* di virulenza, utilizzando le procedure di Real Time PCR allestite dall'EU-RL VTEC per la ricerca di questi patogeni negli alimenti e disponibili nel sito web dell'EU-RL, sezione *Laboratory Methods*. Anche i metodi PCR per la ricerca dei geni associati ai sierogruppi (sierotipizzazione molecolare) e per la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* erano disponibili nel sito web dell'EU-RL.

## 4.3. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando pagine dedicate accessibili attraverso la *Restricted Area* della sezione *Proficiency Tests* del sito web dell'EU-RL VTEC ([www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)), previa presentazione di *User ID* e *password*, inviate a ogni laboratorio insieme al codice identificativo e alle istruzioni necessarie per il *log in*. Al termine del test, i partecipanti hanno avuto la possibilità di stampare direttamente il proprio *test-report* con i risultati inviati e quelli attesi.

## 4.4. Analisi dei risultati

### 4.4.1. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza

La performance analitica dei laboratori nella ricerca dei geni *target* di virulenza dei diversi pato-gruppi di *E. coli* è stata valutata assegnando punti di penalità per i geni identificati in maniera errata.

I punti di penalità sono stati assegnati con i seguenti criteri, basati sulla rilevanza di sanità pubblica:

- **4 punti** per ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione dei geni *vtx*, che rappresentano il target principale del metodo ISO/TS 13136:2012, lo standard internazionale per la ricerca dei VTEC negli alimenti, oggetto dei precedenti PT.
- **2 punti** per ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione degli altri geni di virulenza presi in considerazione nel PT11 (*eae*, *AggR*, *aaiC*, *lt*, *sth*, *stp*, *ipaH*,).
- **1 punto** per ogni risultato riportato come "Non Eseguito".

La somma dei punti di penalità ha generato un punteggio usato per valutare la performance di ogni laboratorio. In particolare, una soglia di 4 punti è stata fissata per definire una performance non adeguata, con l'eccezione dei laboratori che hanno totalizzato 4 punti senza commettere errori riguardanti l'identificazione dei geni *vtx*.

#### **4.4.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O**

La performance analitica è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni ceppo tipizzato in modo errato. I punti sono stati assegnati con i seguenti criteri, in base alla rilevanza di sanità pubblica del sierogruppo in questione, valutata sulla base dei dati sulle infezioni umane in Europa pubblicati periodicamente dall'ECDC:

- **4 punti** per errori nella tipizzazione di ceppi che appartenevano ai 5 sierogruppi maggiormente associati a sindrome emolitico uremica (SEU) in Europa: O26, O103, O111, O145, O157.
- **2 punti** per errori nella tipizzazione di ceppi che appartenevano agli altri 7 sierogruppi associati a infezioni umane e inclusi nello scopo di questo studio: O55, O91, O104, O113, O121, O128, O146.

La somma dei punti di penalità ha generato un punteggio usato per valutare la performance. In particolare, una soglia di 4 punti è stata fissata per definire una performance non adeguata, con l'eccezione dei laboratori che hanno totalizzato 4 punti senza commettere errori riguardanti i ceppi appartenenti ai sierogruppi "top 5".

#### **4.4.3. Valutazione della performance dei laboratori nella tipizzazione dei geni vtx**

La performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx* è stata valutata assegnando punti di penalità per i geni identificati in maniera errata. I punti di penalità sono stati assegnati con i seguenti criteri:

- **2 punti** a ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione dei geni *vtx2a* e *vtx2c*, che sono quelle maggiormente associate ai ceppi che causano SEU.
- **1 punto** a ogni risultato sbagliato riguardante l'identificazione delle altre varianti geniche e a ogni risultato riportato come "Non Eseguito".

La somma dei punti di penalità ha generato un punteggio usato per valutare la performance di ogni laboratorio. In particolare, una soglia di 4 punti è stata fissata per definire una performance non adeguata, con l'eccezione dei laboratori che hanno totalizzato 4 punti senza commettere errori riguardanti i geni *vtx2a* e *vtx2c*.

## **5. RISULTATI**

Due laboratori (L546 e L173) non hanno inviato i risultati.

### **5.1. Identificazione dei geni di virulenza**

I risultati dei test di Real Time PCR per la ricerca dei geni di virulenza caratteristici dei diversi pato-gruppi di *E. coli* sono riportati nella Tabella 2 (1-3).

La Tabella 3 riassume i risultati complessivi dell'Identificazione dei geni di virulenza nei 6 ceppi test.

**Tabella 2 (1). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza caratteristici dei diversi pato-gruppi di *E. coli* (ceppi 1 e 2).** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

Identificazione dei geni di virulenza nel:																		
Ceppo 1 (ETEC)										Ceppo 2 (VTEC)								
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>
Valore atteso	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L115																		
L124																		
L230																		
L381																		
L447																		
L547																		
L718																		
L750										-								
L854																		

**Tabella 2 (2). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza caratteristici dei diversi pato-gruppi di *E. coli* (ceppi 3 e 4).** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

Identificazione dei geni di virulenza nel:																		
Ceppo 3 (EIEC)										Ceppo 4 (VTEC)								
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>lt</i>
Valore atteso	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L115																		
L124																		
L230																		
L381																		
L447																		
L547																		
L718																		
L750																		
L854																		

**Tabella 2 (3). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza caratteristici dei diversi pato-gruppi di *E. coli* (ceppi 5 e 6).** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

Identificazione dei geni di virulenza nel:																		
	Ceppo 5 (EPEC)									Ceppo 6 (EAggEC)								
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>It</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>It</i>
Valore atteso	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
L115																		
L124																		
L230																		
L381																		
L447																		
L547																		
L718																		
L750																		
L854																		

**Tabella 3. Risultati complessivi dell'Identificazione dei geni di virulenza mediante PCR.** Le caselle verdi indicano che per il dato gene sono stati ottenuti risultati corretti per tutti i 6 ceppi test. Le caselle rosse indicano che per un dato gene sono stati riportati risultati errati. I numeri nella casella indicano il numero degli errori.

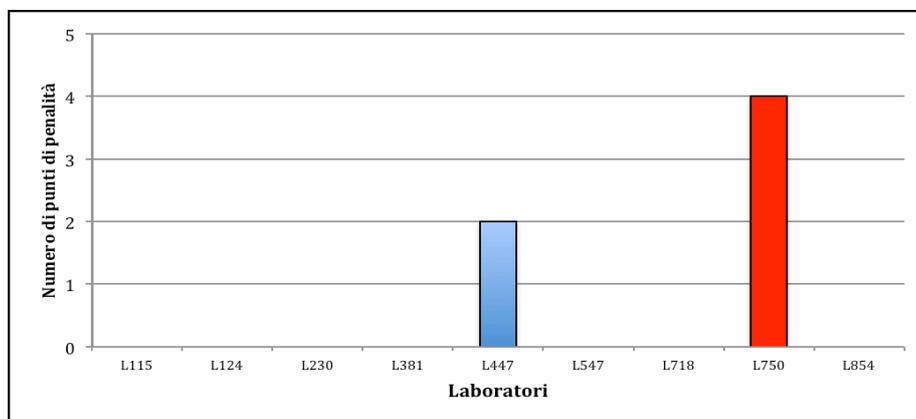
Lab	Identificazione dei geni di virulenza nei 6 ceppi test:									
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>ipah</i>	<i>sth</i>	<i>stp</i>	<i>It</i>	
L115										
L124										
L230										
L381										
L447										1
L547										
L718										
L750	1									
L854										

Sette dei 9 laboratori che hanno inviato i risultati (78%) hanno identificato correttamente la presenza/assenza di tutti i geni target in tutti i ceppi test. Gli altri 2 laboratori hanno

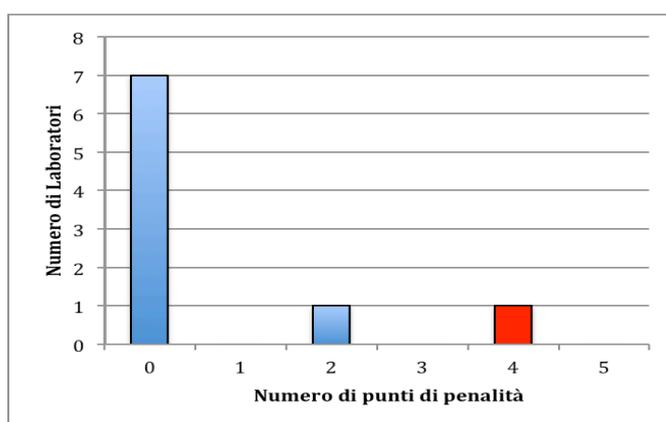
prodotto rispettivamente un falso positivo sul gene *ipaH* nel ceppo 6 (EAggEC) ed un falso negativo sul gene *vtx1* nel campione 2 (VTEC).

La performance analitica dei laboratori nella ricerca dei geni di virulenza è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 4.4.1.

La Figura 1 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti e la Figura 2 il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto. Un Laboratorio ha conseguito un punteggio uguale a 4: poiché questo era dovuto a un errore su un gene *vtx* la sua performance non è stata considerata adeguata.



**Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.1. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.



**Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza: numero di laboratori per punteggio.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.1. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

## 5.2. Identificazione del sierogruppo O dei ceppi VTEC ed EPEC

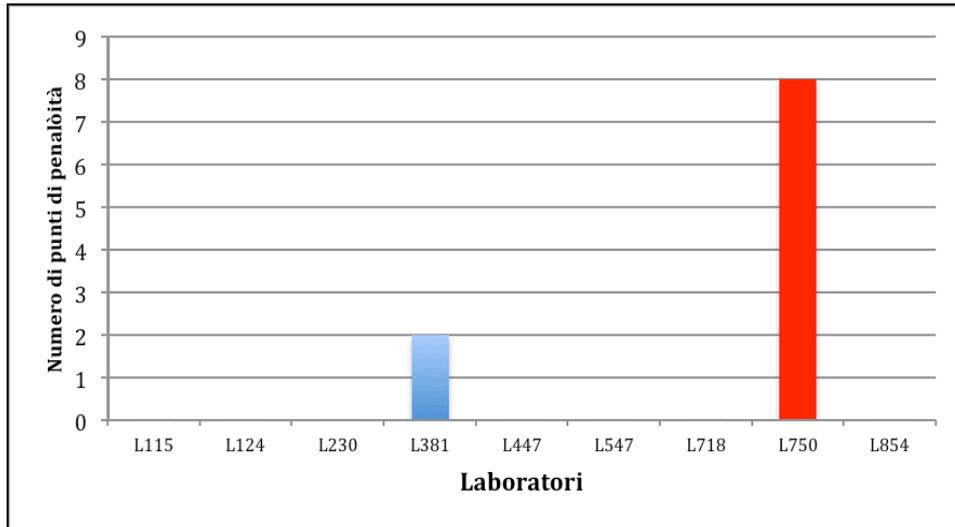
La Tabella 4 riporta i risultati relativi all'Identificazione del sierogruppo dei ceppi VTEC ed EPEC identificati. Sette Laboratori hanno identificato correttamente il sierogruppo dei 3 ceppi test. Un laboratorio (L381) non ha effettuato la sierotipizzazione del ceppo 2 (VTEC O113) e un laboratorio (L750) non ha effettuato la sierotipizzazione.

**Tabella 4. Identificazione del sierogruppo O.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna. Le caselle rosse evidenziano i risultati errati, con il risultato riportato dal Laboratorio. ND: test non effettuato.

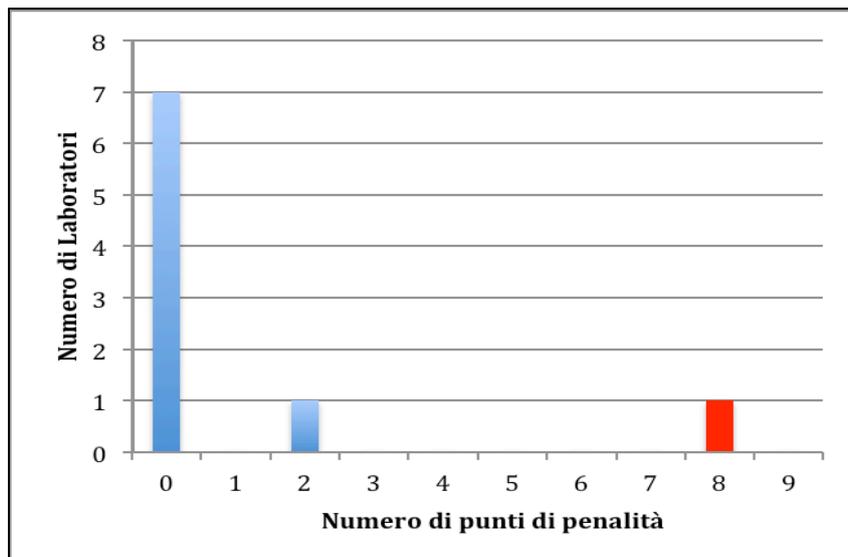
Lab	Identificazione del sierogruppo nel ceppo:		
	2	4	5
<b>Valore atteso</b>	<b>O113</b>	<b>O121</b>	<b>O26</b>
L115			
L124			
L230			
L381	ND		
L447			
L547			
L718			
L750	ND	ND	ND
L854			

A ogni Laboratorio sono stati assegnati punti di penalità utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.4.2. La Figura 3 mostra il punteggio ottenuto da ciascun Laboratorio, mentre nella Figura 4 i Laboratori sono suddivisi in base al punteggio conseguito.

Un Laboratorio (L750) ha conseguito un punteggio maggiore di 4 e la sua performance è stata quindi considerata non adeguata.



**Figura 3. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.2. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.



**Figura 4. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O: numero di laboratori per punteggio conseguito.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.2. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

### 5.3. Identificazione delle varianti dei geni *vtx*

La tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* è stata effettuata da 7 Laboratori. I risultati dei relativi test PCR sono riportati nella Tabella 5.

Nell'insieme, 5 laboratori hanno riportato un totale di 16 errori: 14 falsi positivi e 2 falsi negativi.

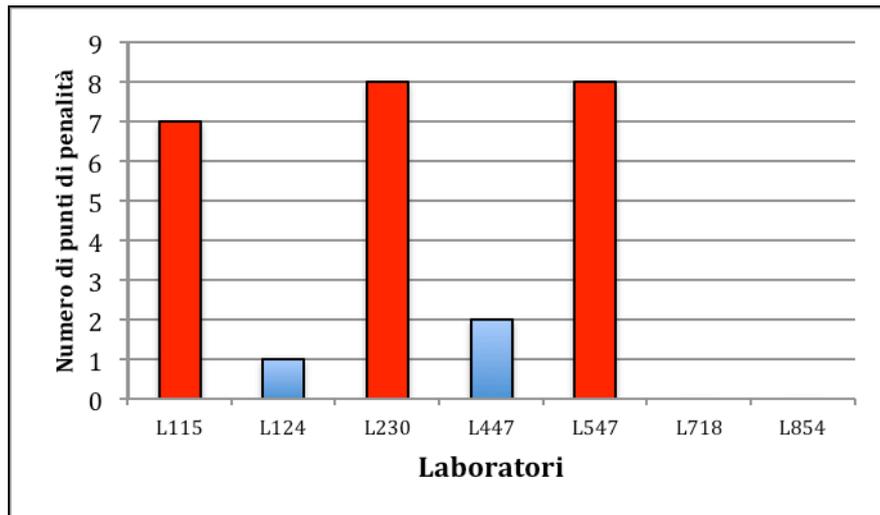
**Tabella 5. Identificazione delle varianti dei geni *vtx* mediante PCR nei campioni 2 e 4.** Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati errati. Le caselle bianche i test non effettuati (ND).

LAB	Identificazione delle varianti geniche nel:																
	Campione 2 ( <i>vtx1+</i> , <i>vtx2+</i> )										Campione 4 ( <i>vtx2+</i> )						
	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2b</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2e</i>	<i>vtx2f</i>	<i>vtx2g</i>
Valore atteso	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L115	+		+				+						+	+		+	
L124											+						
L230	+				-			+		+	-					+	+
L447										+				+			
L547					-						ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L718																	
L854																	

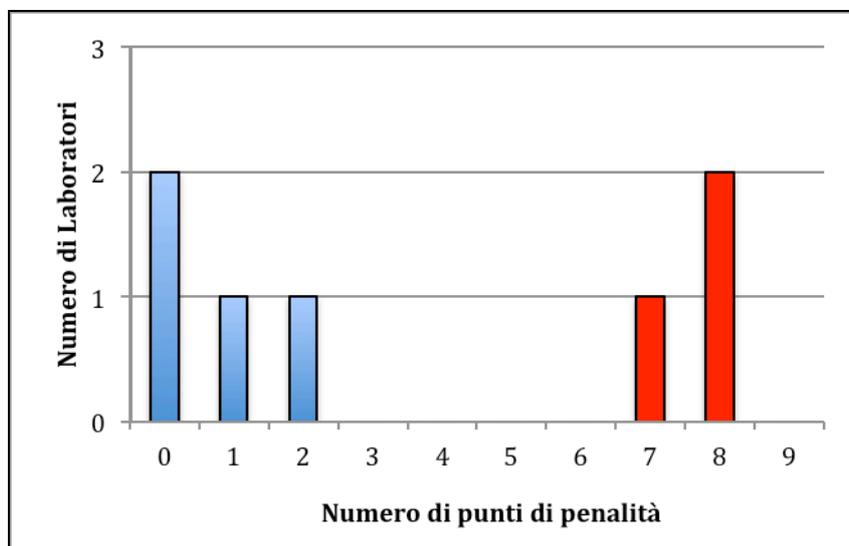
La Figura 5 mostra il punteggio ottenuto da ciascun Laboratorio, assegnando i punti di penalità con i criteri descritti nel paragrafo 4.3.3.

Nella Figura 6 i Laboratori sono suddivisi in base al punteggio conseguito.

Tre Laboratori (L115, L230 e L547) ha conseguito un punteggio maggiore di 4 e la loro performance è stata quindi considerata non adeguata.



**Figura 5. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx*.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.3. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.



**Figura 6. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *vtx*: numero di laboratori per punteggio conseguito.** Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.3. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

## 5. CONSIDERAZIONI

- Questo è il primo studio sull'identificazione di ceppi appartenenti a gruppi di *E. coli* patogeni diversi dai VTEC, quali gli EAggEC, gli ETEC, gli EPEC e gli EIEC. Questi pato-gruppi di *E. coli* costituiscono una causa importante di diarrea del viaggiatore ma

sono stati anche associati a casi sporadici ed episodi epidemici di origine alimentare nei paesi industrializzati.

- Hanno completato lo studio inviando i risultati analitici 9 laboratori di 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali.
- Otto laboratori (89%) hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei geni *vtx* nei 6 ceppi test.
- Otto laboratori (89%) hanno identificato correttamente la presenza/assenza degli altri geni di virulenza presi in considerazione nel PT (*eae*, *AggR*, *aaiC*, *lt*, *sth*, *stp*, *ipaH*,).
- Sette laboratori (78%) hanno identificato correttamente il sierogruppo dei 3 ceppi VTEC/EPEC inclusi nel PT.
- E' aumentato il numero di Laboratori che hanno effettuato la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx*. Tuttavia, la performance è risultata non adeguata per tre dei sette Laboratori che hanno effettuato questo saggio.
- In conclusione, i risultati di questo studio confermano che la maggior parte dei laboratori partecipanti è in grado di identificare correttamente i ceppi VTEC e anche ceppi appartenenti ad altri gruppi patogeni di *E. coli*.