



EU Reference Laboratory for *E. coli*

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

Istituto Superiore di Sanità



**Risultati del 18° test inter-laboratorio (PT18)
per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *Escherichia coli*
produttori di Shigatossina (STEC) e appartenenti ad altri gruppi
di *E. coli* patogeni - 2016**

A cura di:

*Silvia Arancia, Susan Babsa, Gianfranco Brambilla, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Fabio Galati,
Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Stefano Morabito, Rosangela Tozzoli*

1. INTRODUZIONE

Nell'ambito delle attività del Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per l'*Escherichia coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, negli anni scorsi sono stati organizzati sette studi inter-laboratorio (PT1, PT2, PT5, PT6, PT10, PT11 e PT13) per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di Shigatossina (STEC) o appartenenti ad altri gruppi di *E. coli* patogeni.

Nel 2016, il 18° test inter-laboratorio (PT18) ha riguardato l'identificazione di ceppi appartenenti ai patogruppi STEC, *E. coli* Enteroaggregativi (EAEC), *E. coli* Enteroinvasivi (EIEC), *E. coli* Enterotossigeni (ETEC) ed *E. coli* Enteropatogeni (EPEC).

Lo studio aveva i seguenti obiettivi:

1. L'identificazione dei principali geni di virulenza dei ceppi STEC/EPEC: *stx1*, *stx2* ed *eae*.
2. L'identificazione dei marcatori genici degli EAEC.
3. L'identificazione di ceppi di *E. coli* appartenenti ai patogruppi ETEC ed EIEC.
4. La determinazione dei sierogruppi dei ceppi STEC inviati.
5. L'identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* mediante PCR.
6. Una quarta valutazione esterna di qualità sulla tipizzazione molecolare dei ceppi mediante PFGE, in vista dell'inizio della raccolta dei dati di sorveglianza molecolare di patogeni zoonotici coordinata dall'EFSA.

In questa relazione sono presentati e valutati i risultati relativi alla ricerca e alla tipizzazione dei geni virulenza e alla determinazione del sierogruppo. I risultati della tipizzazione molecolare mediante PFGE saranno presentati in una relazione separata.

Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio di Riferimento Europeo per questo patogeno (EURL-VTEC), lo studio nazionale è stato condotto contestualmente a quello dedicato agli LNR per *E. coli* degli Stati Membri della Unione Europea. Il report di quello studio è disponibile presso il sito web dell'EURL-VTEC (http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Report_PT18_def.pdf).

2. STRUTTURA DELLO STUDIO INTERLABORATORIO

Lo studio è stato condotto secondo quanto prescritto dalla norma ISO/IEC 17043:2010 “*Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*” ed era articolato in tre parti:

1. L'identificazione dei patograppi di *E. coli* attraverso l'amplificazione dei rispettivi geni di virulenza, effettuata con metodiche PCR. I geni di virulenza da ricercare erano:

- I geni *stx1*, *stx2* ed *eae* (intimina) per identificare i ceppi STEC.
- Il gene *eae* per gli EPEC e STEC.
- I geni *aaIC* e *aggR*, coinvolti nell'adesione enteroaggregativa, per gli EAEC.
- *lt*, *st_h* and *st_p* per i ceppi ETEC.
- *ipaH* per gli EIEC.

2. La determinazione del sierogruppo dei ceppi STEC, in particolare identificando i ceppi appartenenti a 13 sierogruppi selezionati per la loro rilevanza epidemiologica:

- O26, O103, O111, O145 e O157: i cosiddetti “top five”, perché maggiormente coinvolti nelle infezioni umane gravi.
- O45 ed O121: epidemiologicamente rilevanti e considerati dalla normativa USA insieme ai “top five” come adulteranti nei prodotti carnei.
- O104: rilevante dopo l'epidemia verificatasi nel 2011 in Germania.
- O55, O91, O113, O128, O146: selezionati sulla base della loro prevalenza nelle infezioni umane negli ultimi cinque anni, secondo quanto riportato dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC).

3. L'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*. Ai partecipanti è stato richiesto di identificare i sottotipi dei geni *stx1* (*stx1a*, *stx1c* ed *stx1d*) e *stx2* (da *stx2a* a *stx2g*).

3. PARTECIPANTI

Allo studio hanno aderito 14 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti a 8 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) e un'Agenzia di Tutela della Salute (ATS), di seguito elencati:

- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Laboratorio Regionale di Riferimento per Enterobatteri Patogeni (LRREP-A), Teramo
- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia

- IZS Puglia e Basilicata, Sezione di Putignano (BA)
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Rif. Reg. Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS del Mezzogiorno, U.O. Diagnostica, Sezione di Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O. Microbiologia Alimentare, Sezione di Fuorni (SA)
- IZS del Mezzogiorno, U.O.S. "Biotecnologie applicate agli alimenti-OGM", Portici (NA)
- IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Biotecnologie, Torino
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Controllo Alimenti, Sezione di Fermo
- IZS delle Venezie, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)
- ATS della Città Metropolitana di Milano, Sezioni Biologia Molecolare e Microbiologia Clinica, Laboratorio di Prevenzione, Milano

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I campioni oggetto di analisi erano costituiti da dieci ceppi di *E. coli* (campioni 1-10), selezionati tra quelli della collezione batterica dell' EURL-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*).

Per quanto riguarda la stabilità dei campioni, esperienze precedenti indicavano 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 dei ceppi batterici oggetto dello studio.

I campioni, preparati il 20 Ottobre 2016, erano costituiti da colture batteriche pure seminate per infissione in agar molle (0.3 % agar in terreno nutriente), incubate a 37 °C ± 1 °C per 18 ore e quindi conservate a temperatura ambiente fino alla spedizione mediante corriere, avvenuta il 2 Novembre 2016. I ceppi test sono stati identificati con codici numerici a tre o quattro cifre, assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio. L'omogeneità dei campioni è stata verificata testando 10 campioni selezionati in maniera casuale, per verificare la presenza di tutte le caratteristiche oggetto dello studio.

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

Ceppo	Patogruppo	Siero-gruppo	Geni di virulenza e sottotipo di <i>stx</i>						
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>st_h</i>
1	STEC	O111	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	-	-
2	STEC	O26	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	-	-
3	STEC	O103	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	-	-
4	EAEC	O78	-	-	-	+	+	-	-
5	EAEC	O104	-	-	-	+	+	-	-
6	ETEC	O6	-	-	-	-	-	+	+
7	EPEC	O128	-	-	+	-	-	-	-
8	STEC	O157	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	-	-
9	STEC	O113	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	-	-	-	-	-
10	STEC	O91	-	<i>stx2a</i> <i>stx2d</i>	-	-	-	-	-

4.2. Metodi di laboratorio

L'identificazione dei patogruppi di *E. coli* è stata effettuata mediante amplificazione dei rispettivi geni *target* di virulenza, utilizzando le procedure PCR (*end point* o *real time*) disponibili nel sito web dell'EURL-VTEC, sezione *Laboratory Methods*.

Per quanto riguarda la fase di sierotipizzazione, ai laboratori partecipanti era richiesto di determinare l'antigene O di sierogruppo dei ceppi STEC. I partecipanti potevano applicare qualsiasi metodo sierologico o molecolare in uso presso i laboratori, tuttavia sul sito dell'EURL era disponibile una procedura per la determinazione dei 13 sierogruppi principali mediante PCR convenzionale.

Inoltre, sul sito dell'EURL-VTEC era disponibile un metodo per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* mediante PCR *end-point*, basato su quello descritto da Scheutz *et al.* (*J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 2951-63).

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'EURL-VTEC (www.iss.it/vtec), previa identificazione tramite *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 patogruppi 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 dei diversi determinanti in termini di sanità pubblica:

- 4 punti per ogni risultato errato riguardante l'identificazione dei geni *stx*, che rappresentano i principali determinanti di virulenza dei ceppi STEC;
- 2 punti per ogni risultato errato riguardante l'identificazione degli altri geni di virulenza presi in considerazione nel PT18 (*eae*, *aggR*, *aaiC*, *ipaH*, *lt*, *st_h* ed *st_p*);
- 1 punto per ogni risultato riportato come "Non Eseguito". I risultati non sottomessi, lasciando campi vuoti, sono stati considerati come non eseguiti. Non sono stati attribuiti punti di penalità nel caso di test per l'identificazione dei geni *aggR*, *aaiC*, *lt* e *st_h* non eseguiti su ceppi positivi per il gene *eae*.

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 *stx*, la cui performance è stata considerata accettabile. Nella valutazione della performance dei laboratori in questa fase dello studio sono stati considerati solo i punti di penalità ottenuti per aver riportato risultati errati. I punti di penalità ottenuti per non aver eseguito i test sono stati utilizzati come indicatori di aree di miglioramento per i laboratori.

4.4.2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei sierogruppi

La performance analitica è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni ceppo tipizzato in modo errato. Nell'ambito di questo studio era richiesta la determinazione del sierogruppo dei soli ceppi STEC, per cui nella valutazione della performance sono stati tenuti in considerazione solo gli errori relativi ai ceppi STEC inclusi nel pannello dei campioni. I punti sono stati assegnati con i seguenti criteri, in base alla rilevanza in sanità pubblica del sierogruppo in questione:

- 4 punti per errori (inclusi i risultati “NT”, non typeable) 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 (inclusi i risultati “NT”) nella tipizzazione di ceppi che appartenevano agli altri 7 sierogruppi associati a infezioni umane e inclusi nello scopo di questo studio: O45, O55, O91, O104, O113, O121, O128, O146;
- 1 punto per i risultati scorretti (inclusi i risultati “NT”) relativi ai ceppi non-STECS indipendentemente dal sierogruppo. Un'eccezione è stata fatta per i risultati errati riportati per il ceppo appartenente al sierogruppo O104, a cui sono stati assegnati 2 punti nonostante il ceppo fosse un EAEC.

Non sono stati assegnati punti di penalità nel caso di risultati “NT” sottomessi per i ceppi appartenenti ai sierogruppi O6 e O78, che erano al di fuori dello scopo del PT18, tuttavia è stato assegnato un punto di penalità nel caso di sottomissione di sierogruppi scorretti per questi due ceppi.

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 five” e O104 (nonostante il ceppo appartenente a quest'ultimo sierogruppo fosse un EAEC).

4.4.3. Valutazione della performance dei laboratori nella tipizzazione dei geni *stx*

La performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *stx* è stata valutata assegnando 1 punto di penalità per ogni gene identificato in maniera errata o 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, un punteggio superiore a 4 punti è stato fissato per definire una performance non adeguata.

5. RISULTATI

L'analisi è stata effettuata sulla base dei risultati sottomessi da tutti i 14 laboratori partecipanti allo studio.

5.1. Identificazione dei geni di virulenza e valutazione della performance dei laboratori relativa a questi test

I risultati dei test relativi alla ricerca dei geni di virulenza nei singoli ceppi di *E. coli* sono riportati nella Tabella 2 (1-5). La Tabella 3 riassume invece i risultati complessivi per i 10 ceppi test.

Tabella 2 (1). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 1 e 2). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il test è stato riportato come *Not Done* (Non Eseguito) mentre le caselle vuote in bianco indicano campi non compilati (*null*). Le caselle arancio (sia ND che *null*) indicano risultati che hanno comportato l'assegnazione di punti di penalità.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:													
	Ceppo 1							Ceppo 2						
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>st_h</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>st_h</i>
Valore atteso	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L203														
L341						ND	ND						ND	ND
L480						ND	ND						ND	ND
L555														
L599														
L616														
L635														
L758						ND	ND						ND	ND
L777						ND	ND						ND	ND
L786														
L796														
L881														
L893														
L906		stx2a							stx2a					

Tabella 2 (2). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 3 e 4). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il test è stato riportato come *Not Done* (Non Eseguito) mentre le caselle vuote in bianco indicano campi non compilati (*null*). Le caselle arancio (sia ND che *null*) indicano risultati che hanno comportato l'assegnazione di punti di penalità.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:													
	Ceppo 3							Ceppo 4						
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>
Valore atteso	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
L203														
L341						ND	ND							
L480						ND	ND				ND	ND	ND	ND
L555														
L599														
L616										+		ND		
L635														
L758						ND	ND							
L777						ND	ND							
L786														
L796														
L881														
L893														
L906		<i>stx2a</i>												

Tabella 2 (3). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 5 e

6). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il test è stato riportato come *Not Done* (Non Eseguito) mentre le caselle vuote in bianco indicano campi non compilati (*null*). Le caselle arancio (sia ND che *null*) indicano risultati che hanno comportato l'assegnazione di punti di penalità.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:													
	Ceppo 5							Ceppo 6						
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>
Valore atteso	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
L203														
L341													-	-
L480				ND	ND	ND	ND				ND	ND	ND	ND
L555														
L599														
L616														*
L635														
L758														
L777														
L786														
L796														
L881														
L893														
L906														

* Il laboratorio L616 ha riportato positività anche per *st_p*, risultato che ha comportato l'assegnazione di due punti di penalità.

Tabella 2 (4). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 7 e 8). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il test è stato riportato come *Not Done* (Non Eseguito) mentre le caselle vuote in bianco indicano campi non compilati (*null*). Le caselle arancio (sia ND che *null*) indicano risultati che hanno comportato l'assegnazione di punti di penalità.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:													
	Ceppo 7							Ceppo 8						
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>
Valore atteso	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
L203														
L341													ND	ND
L480						ND	ND						ND	ND
L555														
L599														
L616														
L635														
L758						ND	ND						ND	ND
L777						ND	ND						ND	ND
L786														
L796														
L881	+													
L893														
L906														

Tabella 2 (5). Identificazione mediante PCR dei geni di virulenza di *E. coli* (ceppi 9 e 10). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati. ND indica che il test è stato riportato come *Not Done* (Non Eseguito) mentre le caselle vuote in bianco indicano campi non compilati (*null*). Le caselle arancio (sia ND che *null*) indicano risultati che hanno comportato l'assegnazione di punti di penalità.

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nel:													
	Ceppo 9							Ceppo 10						
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>It</i>	<i>st_h</i>
Valore atteso	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L203														
L341														
L480				ND	ND	ND	ND				ND	ND	ND	ND
L555														
L599											ND	ND	ND	ND
L616					ND							ND		
L635														
L758				ND	ND	ND	ND				ND	ND	ND	ND
L777														
L786														
L796														
L881														
L893														
L906														

Tutti i laboratori hanno riportato i risultati della ricerca dei geni *stx* ed *eae*, un laboratorio non ha effettuato i test per nessuno dei geni target degli EAEC, ETEC ed EIEC, e quattro partecipanti hanno eseguito i test per i patograppi non-STECC solo in maniera parziale. I laboratori che hanno effettuato l'analisi del gene *ipaH*, marcatore degli EIEC, hanno riportato correttamente come assente tale target, risultato non incluso nelle tabelle di seguito riportate.

Sei dei 14 laboratori (42,8 %) hanno identificato correttamente tutti i geni di virulenza dei ceppi test, quattro laboratori hanno riportato un totale di sei errori, mentre i rimanenti quattro non hanno eseguito (o hanno sottomesso un campo *null*) per almeno un gene target.

Dodici laboratori (85,7 %) hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei geni *stx*. Due laboratori hanno riportato un totale di quattro errori, uno sottomettendo tre risultati falsi positivi per la presenza del gene *stx2* ed uno un falso positivo per il gene *stx1*.

Per quanto riguarda l'identificazione degli altri geni di virulenza, un solo laboratorio (L616) ha commesso un errore nella determinazione della presenza del gene *eae* (un falso positivo per il ceppo 4). I geni target degli EAEC sono stati identificati correttamente da tutti i laboratori partecipanti che hanno effettuato questa determinazione, mentre cinque partecipanti non l'hanno eseguita per nessuno o alcuni dei ceppi test. I geni *lt* ed *st_h* sono stati ricercati in tutti i ceppi e identificati correttamente nel ceppo 6 da 10 laboratori, un partecipante non è riuscito ad identificarli nel ceppo ETEC, mentre un altro laboratorio ha riportato un errore nella caratterizzazione di tale ceppo (falso positivo per la presenza del gene *st_p*).

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 in tutti i 10 ceppi test. I numeri nelle caselle rosse e bianche indicano rispettivamente i risultati errati e quelli non riportati (sia ND che *null*).

Lab	Identificazione dei geni di virulenza nei 10 ceppi test:						
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	<i>lt</i>	<i>st_h</i>
L203							
L341						1	1
L480				5	5	5	5
L555							
L599				2	2	2	2
L616*			1	1	5		
L635				1	1		
L758				2	2	2	2
L777							
L786							
L796							
L881	1						
L893							
L906		3					

*L616 ha riportato un falso positivo per il gene *st_p* che non è compreso in questa tabella, in quanto non presente nei ceppi test.

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.

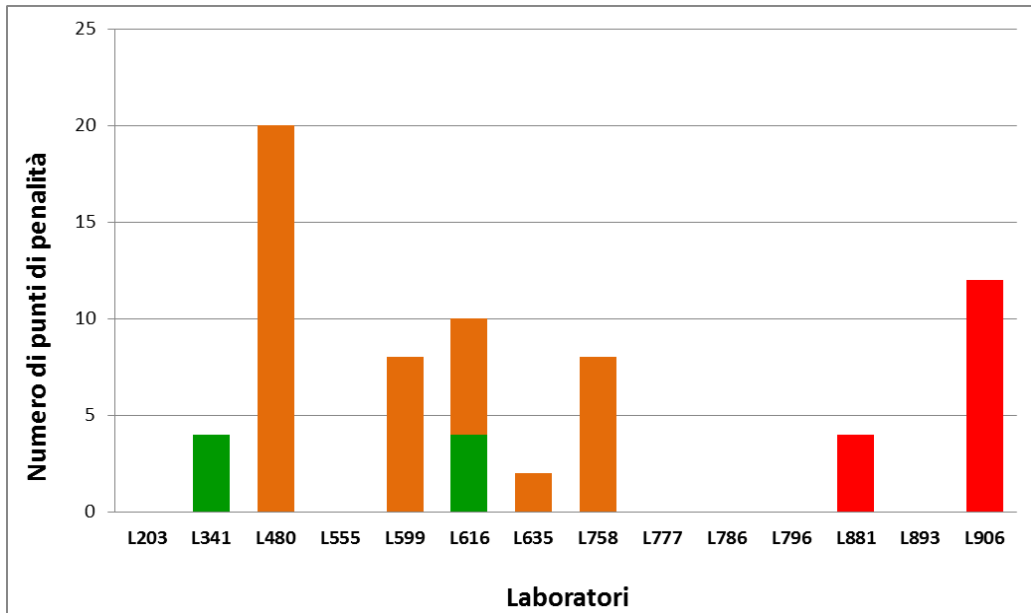


Figura 1. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.1. Le barre rosse indicano i punti assegnati per risultati errati per i laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata, le barre verdi i punti di penalità ottenuti dai laboratori per aver riportato risultati errati la cui somma è ancora sotto la soglia e le bande gialle quelli assegnati per risultati non riportati.

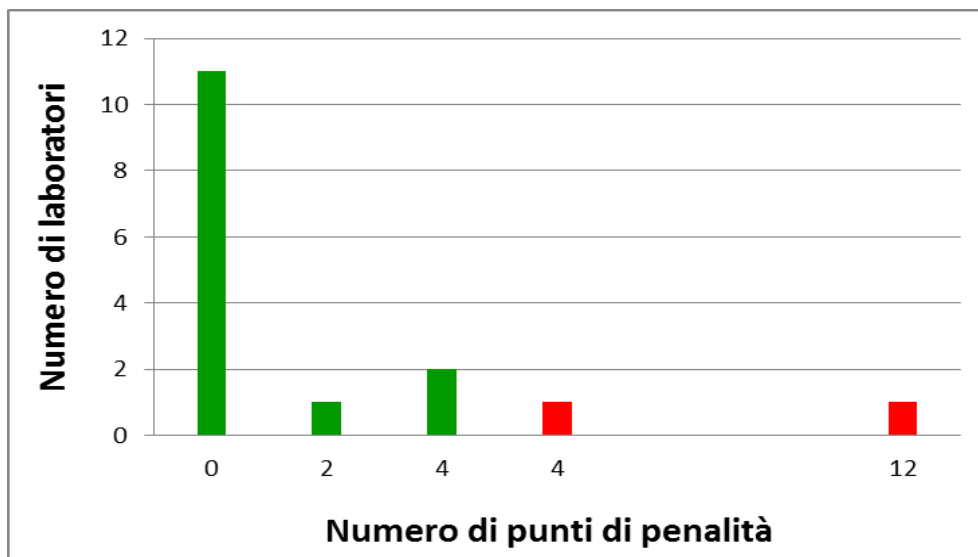


Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza: numero di laboratori per punteggio. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.1, tenendo conto solo dei risultati errati. Le barre rosse indicano i laboratori la cui performance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

Tenendo in considerazione solo i punti di penalità relativi a risultati errati, due laboratori hanno conseguito punti di penalità tali da non considerare accettabile la loro performance. Due laboratori hanno ottenuto un punteggio di penalità totale pari a 4, ma i punti di penalità non riguardavano errori nella identificazione dei geni *stx*, e la loro performance è stata considerata accettabile.

5.2. Identificazione del sierogruppo dei ceppi test e valutazione della performance dei laboratori in questa analisi

Tutti i laboratori hanno partecipato a questa fase dello studio inter-laboratorio e la Tabella 4 riporta i risultati relativi all'identificazione del sierogruppo dei ceppi test. Quattro laboratori (28,6 %) hanno identificato correttamente il sierogruppo degli otto ceppi appartenenti ai 13 oggetto dello studio e riportato correttamente i ceppi O78 e O6 come "NT" (*non typeable*). Tutti i partecipanti hanno riportato risultati corretti per i ceppi appartenenti ai sierogruppi "top-five" inclusi nel test (ceppi 1, 2, 3 e 8). Dieci laboratori hanno riportato un totale di nove errori per il sierogruppo di ceppi STEC e 12 risultati non corretti relativi al sierogruppo di ceppi non-STECS. Per quanto riguarda i risultati non corretti per i ceppi STEC, quattro laboratori hanno riportato errori per il ceppo STEC O113 e cinque non hanno identificato il sierogruppo O91. Nel caso dei ceppi appartenenti agli altri patogruppi, sette laboratori non hanno identificato il sierogruppo O104, quattro il sierogruppo O128, un partecipante ha riportato come O145 il ceppo O78 ed un altro laboratorio ha riportato come O121 il ceppo O6 (Tabella 4).

La performance analitica dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al 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. Tre laboratori hanno conseguito un punteggio maggiore di 4, riportando risultati non corretti anche per il sierogruppo O104, e la loro performance è stata quindi considerata non adeguata.

Tabella 4. Identificazione dell'antigene O di sierogruppo. 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. Le caselle arancio indicano risultati non corretti relative a ceppi non-STEC.

Lab	Identificazione del sierogruppo nel ceppo:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valore atteso	O111	O26	O103	O78	O104	O6	O128	O157	O113	O91
L203				NT		NT				
L341				NT	NT	NT				
L480				NT	NT	NT	NT		NT	NT
L555				NT		NT				
L599				NT	NT	NT				
L616				NT	NT	NT	NT		NT	NT
L635				NT		NT				NT
L758				NT	NT	NT	NT			
L777				NT	NT	NT	NT		NT	NT
L786				NT		NT			NT	
L796				NT		NT	O128ac			
L881				NT	NT	O121				NT
L893				NT		NT				
L906				O145		NT				

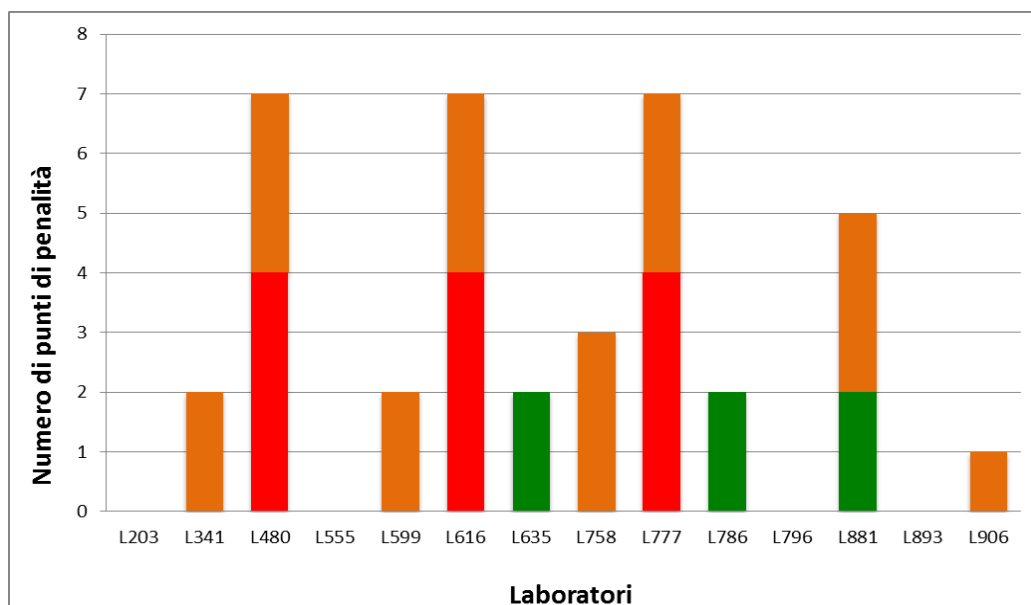


Figura 3. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.2. Le barre arancioni indicano i punti di penalità assegnati in seguito a risultati non corretti relativi ai ceppi non-STEC. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance non è stata considerata adeguata.

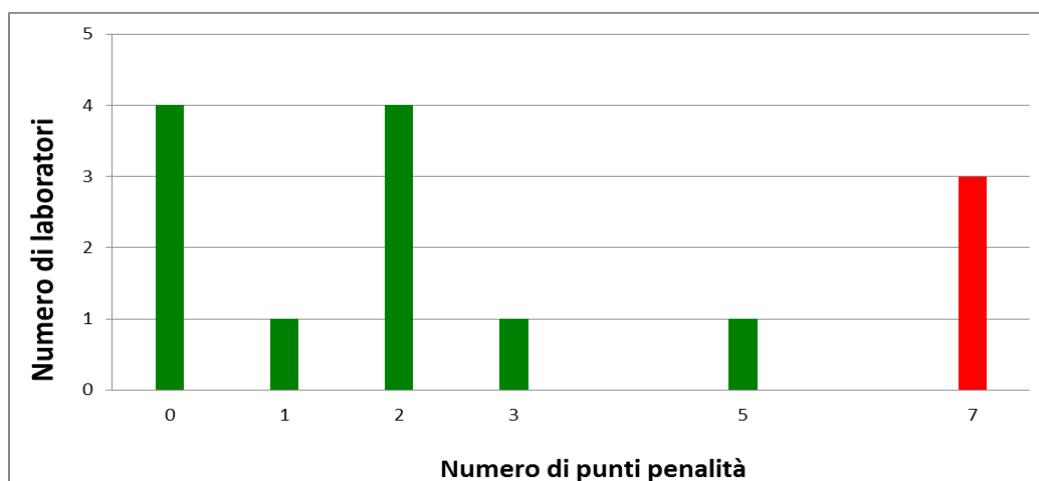


Figura 4. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione del sierogruppo O: numero di laboratori per punteggio conseguito. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui performance è stata considerata non adeguata.

5.3. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx*

I risultati della identificazione dei sottotipi del gene *stx1* sono riportati nella Tabella 5.

La tipizzazione dei geni *stx* è stata effettuata da 11 laboratori. I laboratori L480, L616 e L777 non hanno sottomesso i risultati per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* e pertanto non compaiono nelle tabelle relative a questa analisi.

Tabella 5 (1). Identificazione delle varianti dei geni *stx1* mediante PCR nei ceppi 1 e

2. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>stx1</i> nel:					
	Ceppo 1			Ceppo 2		
	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>
Valore atteso	+	-	-	+	-	-
L203						
L341						
L555						
L599						
L635						
L758						
L786						
L796						
L881						
L893						
L906*						

Tabella 5 (2). Identificazione delle varianti dei geni *stx1* mediante PCR nei ceppi 3 e 9. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>stx1</i> nel:					
	Ceppo 3			Ceppo 9		
	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>
Valore atteso	+	-	-	-	+	-
L203						
L341						
L555						
L599				+		
L635						
L758						
L786						
L796						
L881				+		
L893						
L906*						

* L906 ha riportato la presenza anche del gene *stx2a* nei ceppi 1, 2 e 3, risultati valutati come falsi positivi cui è stato assegnato 1 punto di penalità ciascuno.

Nove laboratori hanno riportato risultati corretti per i sottotipi del gene *stx1* nei quattro ceppi *stx1+*. Due laboratori hanno riportato un risultato falso positivo per il sottotipo *stx1a* nel ceppo test 9.

I risultati della tipizzazione del gene *stx2* sono riportati nelle Tabelle 6 (1-2).

Tabella 6 (1). Identificazione delle varianti dei geni *stx2* mediante PCR nei ceppi 8 e 9. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori riportati all'inizio di ogni colonna; le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>stx2</i> nel:													
	Ceppo 8							Ceppo 9						
	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>
Valore atteso	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L203														
L341														
L555														
L599			+											
L635														
L758														
L786														
L796														
L881		+												
L893														
L906														

Lab	Identificazione delle varianti del gene <i>stx2</i> nel:						
	Ceppo 10						
	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>
Valore atteso	+	-	-	+	-	-	-
L203							
L341			+				
L555							
L599			+				
L635			+				
L758			+				
L786			+				
L796			+				
L881			+				
L893			+				
L906							

Tre laboratori (L203, L555 e L906) hanno identificato correttamente tutti i sottotipi *stx2* nei 3 ceppi *stx2+*. Gli altri 8 laboratori hanno riportato un totale di 10 risultati errati, tutti falsi positivi, la maggior parte dei quali (9 di 10) riguardava il sottotipo *stx2c*. In particolare, otto dei dieci errori riguardavano l'erronea identificazione del sottotipo *stx2c* nel ceppo 10, positivo invece per il solo sottotipo *stx2a*.

Infine, un laboratorio ha riportato tre risultati falsi positivi per il sottotipo *stx2a* nei ceppi 1, 2 e 3 (Tabella 2 e nota Tabella 5).

I risultati della identificazione dei sottotipi dei geni *stx* sono riassunti nella Tabella 7.

Tabella 7. Identificazione delle varianti dei geni *stx* mediante PCR: risultati complessivi. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati errati.

Lab	Identificazione delle varianti dei geni <i>stx</i> nei 6 ceppi STEC									
	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>
L203										
L341						1				
L555										
L599	1					2				
L635						1				
L758						1				
L786						1				
L796						1				
L881	1				1	1				
L893						1				
L906				3						

Complessivamente, due laboratori hanno tipizzato correttamente i geni *stx1* ed *stx2* nei 6 ceppi STEC. Gli altri nove partecipanti hanno commesso da uno ad un massimo di tre errori ciascuno, principalmente nella tipizzazione del gene *stx2*.

La performance analitica dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *stx* è stata valutata assegnando punti di penalità secondo i criteri riportati al paragrafo 4.4.3.

La Figura 5 mostra i punteggi ottenuti dai laboratori partecipanti e la Figura 6 il numero dei laboratori suddivisi per il punteggio ottenuto.

Nessun laboratorio ha conseguito un punteggio di penalità maggiore di 4 a causa di risultati errati o non riportati e la performance di tutti i partecipanti è stata considerata adeguata.

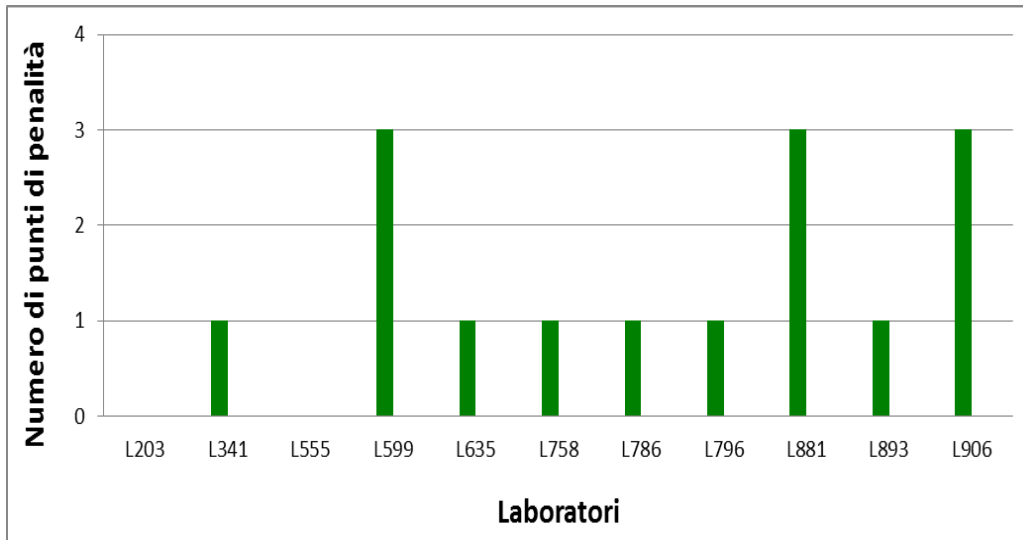


Figura 5. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *stx*.

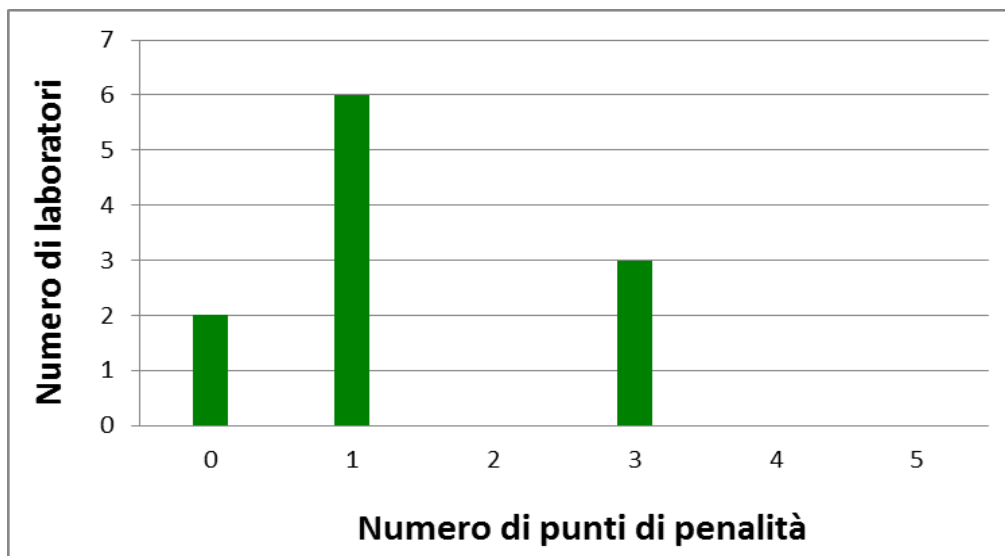


Figura 6. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione delle varianti dei geni *stx*: numero di laboratori per punteggio conseguito. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 4.4.3.

6. CONSIDERAZIONI

1. Quattordici laboratori, afferenti a otto Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZZSS) e una Agenzia di Tutela della Salute (ATS) hanno partecipato a questo studio inter-laboratorio sulla identificazione e caratterizzazione dei ceppi di *E. coli* patogeni.
2. Sei dei 14 laboratori (42,8 %) hanno identificato correttamente tutti i geni di virulenza dei ceppi test.
3. Dodici laboratori (85,7 %) hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei geni *stx* ed un solo laboratorio ha commesso un errore nella determinazione della presenza del gene *eae*.
4. Un laboratorio non ha effettuato la ricerca dei geni *aggR* e *aaiC* target degli EAEC e altri quattro laboratori hanno riportato risultati parziali per questa analisi. Tuttavia, tali geni sono stati identificati correttamente da tutti i laboratori partecipanti che hanno effettuato questa determinazione.
5. Dieci laboratori hanno identificato correttamente i geni *lt* ed *st_h*, un laboratorio non è stato in grado di identificare il ceppo ETEC, un partecipante non ha condotto l'analisi per i geni target degli ETEC e altri tre hanno riportato risultati parziali.
6. Tutti i partecipanti che hanno condotto l'analisi per il gene *ipaH* lo ha correttamente riportato come negativo in tutti i ceppi test.
7. La performance nell'identificazione dei geni di virulenza è stata valutata non adeguata solo per due laboratori, in seguito alla sottomissione di alcuni risultati non corretti.
8. Nel corso dell'analisi volta ad identificare i sierogruppi dei 10 ceppi inviati, la performance è stata valutata non adeguata per tre laboratori (21,4 %).
9. La tipizzazione delle varianti dei geni *stx* è stata eseguita da 11 laboratori. Due laboratori hanno tipizzato correttamente tutte le varianti geniche *stx* nei sei ceppi STEC e nessun laboratorio ha conseguito un punteggio di penalità maggiore di 4 a causa di risultati errati o non riportati e la performance di tutti i partecipanti è stata considerata adeguata.
10. In conclusione, i risultati di questo studio confermano che la maggior parte dei laboratori partecipanti è in grado di identificare correttamente i geni di virulenza degli *Escherichia coli* diarreegenici e i principali sierogruppi dei ceppi STEC.