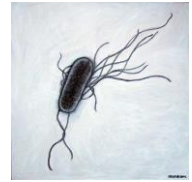




**Risultati del 26° test inter-laboratorio nazionale (PT26)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shigatossina (STEC) - 2019**

A cura di: *Silvia Arancia, Arianna Boni, Gianfranco Brambilla, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Fabio Galati, Federica Gigliucci, Arnold Knijn, Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Margherita Montalbano Di Filippo, Stefano Morabito, Rosangela Tozzoli*



1. STRUTTURA E OBIETTIVI DELLO STUDIO

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 quattro parti:

1. L’identificazione dei geni di virulenza dei ceppi di *E. coli* produttori di Shiga tossine (*stx1*, *stx2* ed *eae*) effettuata con metodiche PCR convenzionale o Real Time.

2. La determinazione del sierogruppo dei ceppi STEC inviati ai laboratori partecipanti. La performance analitica è stata valutata relativamente alla capacità di identificare, con qualunque metodica, almeno i seguenti 13 sierogruppi, selezionati per la loro rilevanza epidemiologica o normativa:

- O26, O103, O111, O145 e O157: i cosiddetti “*top five*”, perché maggiormente coinvolti nelle infezioni umane gravi.
- O45 e O121: epidemiologicamente rilevanti e considerati dalla normativa USA insieme ai “*top five*” come adulteranti nei prodotti carnei.
- O104: rilevante dopo l’epidemia verificatisi nel 2011 in Germania.
- O55, O91, O113, O128, O146: selezionati sulla base della loro prevalenza nelle infezioni umane in Europa ultimi 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* e *stx1d*) e *stx2* (da *stx2a* a *stx2g*) utilizzando il metodo basato sulla PCR convenzionale descritto dal Scheutz *et al.*, 2012 o WGS.

4. La capacità di produrre dati di tipizzazione degli isolati con metodiche “whole genome” (PFGE o WGS) e di identificare ceppi correlati filogeneticamente.



L'esercizio è stato condotto su un set di sette ceppi STEC e questo documento rappresenta la valutazione complessiva dello studio interlaboratorio PT26.

2. PARTECIPANTI

Allo studio hanno aderito 9 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, afferenti ai 6 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) 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 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 Venezie, Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)
- IZS Venezie, Sezione di Legnaro (PD)

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

Sette ceppi di *E. coli* (campioni 1-7), selezionati tra quelli delle collezioni batteriche del LNR per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità e controllati per le caratteristiche genetiche e fenotipiche oggetto dello studio, sono stati inviati ai laboratori del controllo ufficiale partecipanti allo studio.

Le caratteristiche dei ceppi sono riportate nella Tabella 1a e sono state considerate come "valori reali" (*gold standard*). La Tabella 1b riporta i geni di virulenza identificati mediante sequenziamento dell'intero genoma (WGS) presso l'ISS.



I campioni, preparati il 5 Ottobre 2019, 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 ed identificate con codici numerici generati casualmente (3 o 4 cifre). Ciascun ceppo in ogni set era etichettato con un codice diverso e ad ogni set di ceppi inviato ai laboratori partecipanti corrispondeva un set di codici differenti. L'omogeneità dei campioni è stata verificata in data 8 Ottobre 2019, saggiando cinque set di ceppi selezionati in maniera casuale, per verificare la presenza di tutte le caratteristiche oggetto dello studio. I rimanenti campioni test sono stati conservati a temperatura ambiente fino al 14 ottobre 2019, quando i pacchi sono stati inviati ai laboratori partecipanti tramite corriere. Dati precedentemente prodotti presso il Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* indicano, per queste preparazioni di ceppi batterici, una stabilità di oltre un mese. Tutti i partecipanti hanno ricevuto i ceppi test entro 24 ore dalla spedizione, ad eccezione di un laboratorio (L931) che li ha ricevuti dopo 48 ore.

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

Ceppo	Patogruppo	Sierotipo	ST	Geni di virulenza e sottotipo stx		
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
1	STEC	O121:H19	655	-	<i>stx2a</i>	+
2	STEC	O121:H19	655	-	<i>stx2a</i>	+
3	STEC	O128ab:H2	25	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	-
4	STEC	O91:H14	33	<i>stx1a</i>	<i>stx2b</i>	-
5	STEC	O55:H7	335	-	<i>stx2a</i>	+
6	STEC	O121:H19	655	-	<i>stx2a</i>	+
7	STEC	O145:H28	137	<i>stx1a</i>	-	+



Tabella 1b. Geni di virulenza identificati mediante WGS

Ceppo	Geni di virulenza
1	<i>cba, cma, eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espl, espJ, espP, lpfA, nleA, nleB, nleC, stx2a, tir, toxB</i>
2	<i>cba, cma, eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espl, espJ, espP, lpfA, nleA, nleB, nleC, stx2a, tir, toxB</i>
3	<i>ehxA, espl, iha, ireA, lpfA, mchB, mchC, mchF, stx1c, stx2b, subA</i>
4	<i>ehxA, espl, iha, lpfA, mchB, mchC, mchF, mcmA, senB, stx1a, stx2b, subA, tia</i>
5	<i>astA, efa1, espA, espB, espJ, etpD, nleA, nleB, nleC, stx2a, tir</i>
6	<i>efa1, ehxA, espA, espB, espl, espJ, espP, lpfA, nleA, nleB, nleC, stx2a, tir, toxB</i>
7	<i>celB, cif, efa1, ehxA, espA, espB, espJ, iha, nleA, nleB, nleC, stx1a, tir</i>

3.2. Metodi di laboratorio

L'obiettivo dello studio era l'identificazione dei principali geni di virulenza dei ceppi STEC mediante PCR (convenzionale o Real Time), applicando qualsiasi metodo molecolare in uso nella routine analitica dei laboratori partecipanti.

Per quanto riguarda la sierotipizzazione, ai partecipanti era richiesta la determinazione dell'antigene O di sierogruppo dei ceppi STEC. Dato il grande numero di sierogruppi che caratterizzano i ceppi di *E. coli*, ai laboratori è stato chiesto di restringere il target analitico a un gruppo di 13 sierogruppi, selezionati per la loro rilevanza epidemiologica o normativa: O26, O45, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O146, O157. I partecipanti potevano applicare qualsiasi metodo sierologico o molecolare in uso nella routine analitica, incluso il WGS.

Metodi di analisi per la determinazione di tutte queste caratteristiche sono disponibili anche nel sito web dell'EURL-VTEC, sezione *Laboratory Methods* (<http://old.iss.it/vtec/index.php?lang=2&tipo=3>). Nella stessa sezione del sito è inoltre presente un protocollo per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* mediante PCR *end-point*, basato sul metodo descritto da Scheutz *et al.* (*J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 2951-63).



Per la partecipazione al PT26, i laboratori potevano scegliere di applicare il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) per caratterizzare i ceppi test e riportare i risultati ottenuti con questa tecnica.

Un altro obiettivo del PT26 era l'esecuzione dell'analisi filogenetica degli isolati. Le metodologie utilizzabili per questo esercizio erano la PFGE e l'analisi WGS, a scelta del laboratorio. L'analisi WGS poteva essere eseguita sia attraverso l'identificazione dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) o mediante determinazione del profilo allelico dell'intero genoma (wgMLST) o di un pannello di geni "core" (cgMLST). Nel caso i cui i laboratori partecipanti abbiano utilizzato la PFGE, è stato richiesto di riportare il numero di bande identificate per ciascun ceppo e il numero di bande condivise da ogni ceppo, rapportati ad uno dei ceppi test selezionato dal laboratorio. Nel caso dell'utilizzo del WGS, è stato richiesto invece di indicare il metodo e lo schema utilizzati per l'analisi, nel caso di metodiche MLST, e di indicare il numero di SNPs o di alleli di differenza tra ogni ceppo e un ceppo test selezionato dal laboratorio. In ogni caso al termine dell'analisi filogenetica era richiesto di indicare quali ceppi test facessero parte di un cluster di isolati.

3.3. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I laboratori hanno inviato i loro risultati attraverso una pagina dedicata accessibile attraverso la *Restricted Area* della sezione *Proficiency Tests* del sito web dell'EURL-VTEC (https://w3.iss.it/site/PT_CRLEC/login.aspx), previo inserimento delle credenziali di accesso comunicate ad ogni laboratorio insieme alle istruzioni necessarie. Dopo l'accesso, i partecipanti dovevano inserire nello *Shipment form* le informazioni relative a data di arrivo, temperatura e qualità dei campioni, e avevano la possibilità di specificare qualsiasi problema riguardante la consegna e/o l'imballaggio dei campioni nel campo note. Al termine del test, i partecipanti hanno inoltre avuto la possibilità di stampare direttamente dalla pagina protetta del sito il proprio certificato di partecipazione individuale contenente i risultati inviati a confronto con quelli attesi e lo specifico codice identificativo del laboratorio.



3.4. Analisi dei risultati

3.4.1 Valutazione della performance dei laboratori.

La performance di ogni laboratorio è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni risultato errato nell'identificazione dei geni di virulenza e del sierogruppo dei ceppi STEC in accordo con il seguente schema:

- **4 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione della presenza dei geni *stx*.
- **2 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione del gene *eae*.
- **2 punti** per errori nella determinazione dell'antigene somatico O oppure dei geni associati ai 13 sierogruppi indicati nel paragrafo 4.2.
- **1 punto** per ogni risultato riguardante l'identificazione dei sierogruppi, riportato come "Not Done" o "Null".
- **1 punto** per ogni risultato errato riguardante l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*.

La somma dei punti di penalità ottenuti è stata usata per valutare la competenza dei Laboratori. Una soglia di quattro punti di penalità è stata fissata per definire una performance non adeguata.

Le penalità assegnate ai risultati errati nell'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* non sono state considerate per la determinazione della competenza dei laboratori, ma come indicatori per evidenziare le aree in cui il metodo stesso o il supporto del LNR per *E. coli* necessitava di essere migliorato.



4. RISULTATI

4.1. Identificazione dei geni di virulenza e caratterizzazione dei sottotipi dei geni *stx* nei ceppi test

I risultati trasmessi dai laboratori partecipanti relativi alla caratterizzazione dei ceppi sono riportati nelle tabelle da 2 a 4. Due laboratori (L525 ed L835) non hanno sottomesso alcun risultato e sono stati esclusi dalla valutazione.

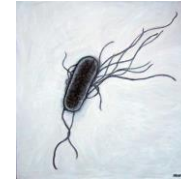


Tabella 2. Identificazione dei geni di virulenza di *E. coli* mediante metodi standard (PCR). Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, in accordo con i valori attesi riportati in giallo all'inizio di ogni colonna. Le caselle rosse evidenziano i risultati errati.

Lab	Determinazione dei geni di virulenza nei ceppi:																				
	1			2			3			4			5			6			7		
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
Valore atteso	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
L156																					
L167																					
L387																					
L460																					
L694																					
L853																					
L931																					



Tabella 3. Identificazione dell'antigene O di sierogruppo (PCR o siero-agglutinazione). 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 l'indicazione del risultato riportato dal Laboratorio.

Lab	Sierogruppo / Sierotipo identificato nel ceppo:						
	1	2	3	4	5	6	7
Valore atteso	O121:H19	O121:H19	O128ab:H2	O91:H14	O55:H7	O121:H19	O145:H28
L156			O128				
L167			O128				
L387			O128		O NT		
L460			O128				
L694			O128				
L853			O128				
L931			O128				



Tabella 4 pannello 1. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 1. 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 dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L156										
L167										
L387										
L460										
L694										
L853										
L931										

Tabella 4 pannello 2. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 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 dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L156										
L167										
L387										
L460					+					
L694										
L853										
L931										



Tabella 4 pannello 3. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 3. 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 dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
L156					-					
L167	+									
L387										
L460										
L694										
L853										
L931										

Tabella 4 pannello 4. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 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.

Lab	Identificazione dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L156	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L167										
L387		+								
L460										
L694										
L853					-					
L931										



Tabella 4 pannello 5. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 5. 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 dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L156										
L167										
L387										
L460					+					
L694										
L853										
L931										

Tabella 4 pannello 6. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 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.

Lab	Identificazione dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L156										
L167										
L387										
L460										
L694										
L853										
L931										



Tabella 4 pannello 7. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2* nel ceppo 7. 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 dei sottotipi dei geni <i>stx</i>									
	<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>
Valore atteso	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L156										
L167										
L387			+							
L460										
L694										
L853										
L931										

4.2 Analisi di sottotipizzazione e filogenetiche

I risultati relativi a questa attività sono stati sottomessi da quattro laboratori (L156, L460, L853 e L931). Di questi un laboratorio (L853) ha analizzato i ceppi mediante WGS e ha eseguito l’analisi filogenetica con la metodica di cgMLST. Dei rimanenti tre laboratori, uno (L156) ha eseguito l’analisi sia tramite PFGE che WGS con analisi degli SNPs, e due (L460 e L931) hanno eseguito solamente la PFGE. I risultati dettagliati sono riportati nelle Tabelle da 5 a 7, e nella Figura 1.



Tabella 5. Risultati dell'analisi PFGE. Le caselle verdi indicano i risultati in accordo con quelli attesi, mentre le caselle arancioni e rosse evidenziano rispettivamente i casi in cui il numero di bande di differenza rispetto all'atteso è minore o uguale a 2 e quando invece è maggiore di 2.

Lab	Ceppo numero:							Bande di differenza tra ceppo 1 e 2
	1	2	3	4	5	6	7	
Numero di bande attese	18	19	15	18	14	19	16	≤2
L156	17	17	15	20	22	19	15	≥6
L460	22	19	19	20	18	23	21	≥3
L931	19	21	16	20	15	20	19	≥3

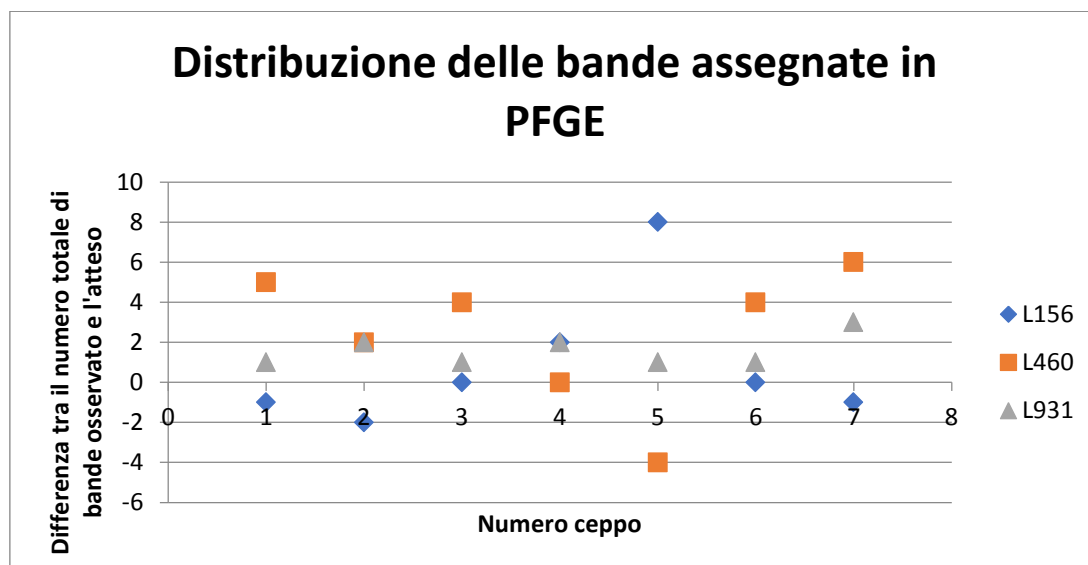


Figura 1. Distribuzione del numero di bande assegnate dai laboratori per ogni ceppo, espresso come differenza dal numero di bande attese.



Tabella 6. Risultati dell'analisi WGS. Le caselle verdi indicano la corretta identificazione del cluster composto dai ceppi 1 e 2.

	Lab	Ceppo numero:						
		1	2	3	4	5	6	7
Metodo usato	Appartenenza al cluster	Sì	Sì	No	No	No	No	No
Analisi SNPs (CSI Phylogeny 1.4)	L156	Sì	Sì	No	No	No	No	No
cgMLST (Enterobase, 2,513 loci)	L853	Sì	Sì	No	No	No	No	No

Tabella 7. Dettaglio dei risultati dei partecipanti in termini di differenze con i ceppi rappresentativi del cluster, identificate attraverso analisi WGS.

	Lab	Ceppo numero:						
		1	2	3	4	5	6	7
Differenza dai ceppi del cluster e metodo usato	Differenza in numero di alleli cgMLST (INNUENDO, 2360 loci)	0	4	1868	1865	2161	78	2166
Differenza in numero di SNPs (metodo CSI Phylogeny 1.4)	L156	0	0	1592	1568	2569	23	3231
Differenza in numero di alleli cgMLST (Enterobase, 2,513 Loci)	L853	0	0	2023	2004	2352	84	2341



5. Valutazione della competenza dei Laboratori partecipanti

Il calcolo dei punti di penalità è stato effettuato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.4.1 ed i risultati di questa analisi sono riportati nelle figure 2 e 3. Il valore soglia per una competenza dei laboratori non soddisfacente era fissato a 4.

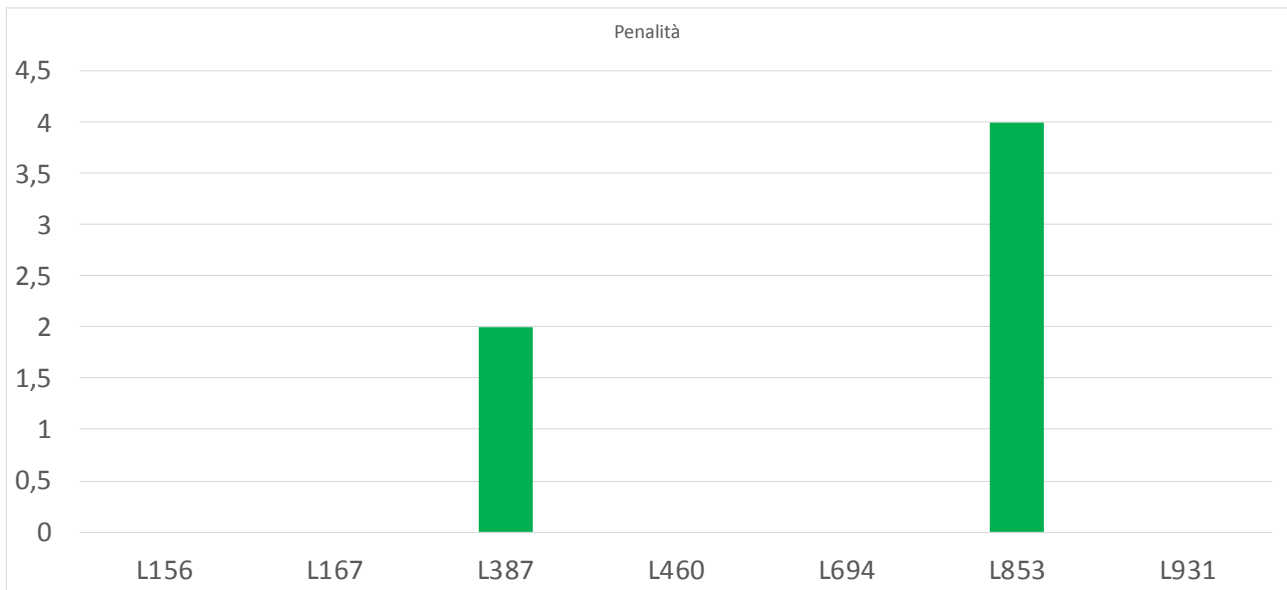


Figura 2. Valutazione della performance dei laboratori nell'identificazione dei geni di virulenza. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.4.1 le barre verdi i punti di penalità ottenuti dai laboratori per aver riportato risultati errati la cui somma è ancora sotto la soglia.

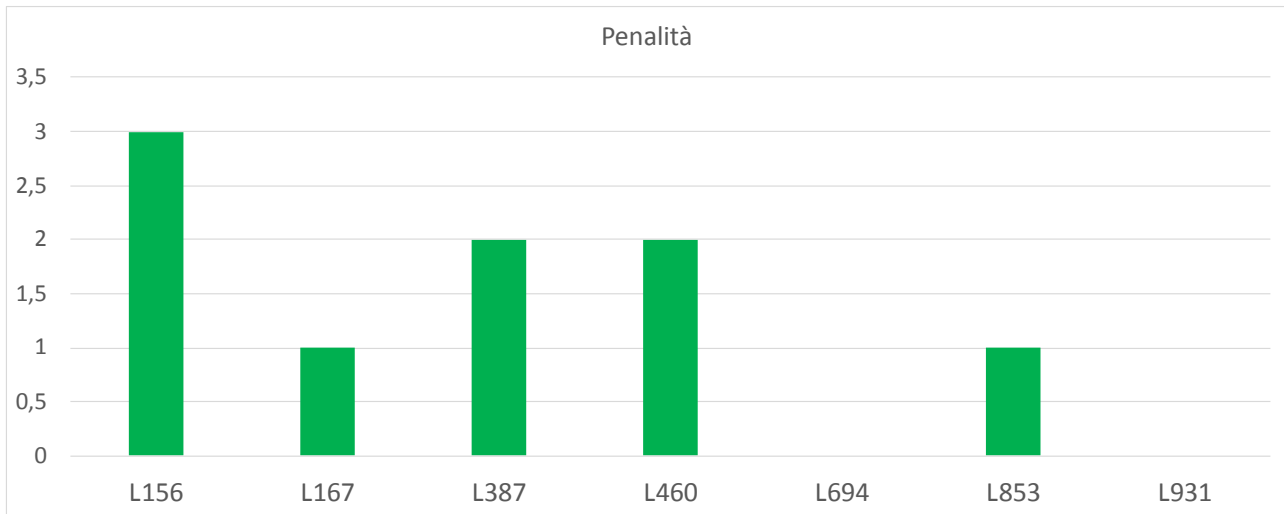
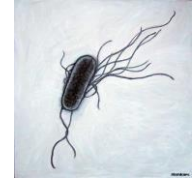


Figura 3. Valutazione della performance dei laboratori nella caratterizzazione dei sottotipi dei geni *stx*. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.4.1; le barre verdi indicano che la somma dei punti di penalità ottenuti dai laboratori per risultati errati è ancora sotto la soglia.

6. CONSIDERAZIONI FINALI

1. Nove laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno accettato di partecipare allo studio. Sette hanno partecipato attivamente e riportato i risultati attraverso la piattaforma web.
2. Tutti i Laboratori partecipanti hanno mostrato una competenza soddisfacente relativamente all'identificazione dei geni di virulenza dei ceppi STEC e alla determinazione del sierogruppo dei ceppi inviati.
3. L'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* è stata effettuata da tutti i laboratori che hanno riportato i risultati relativi a questa attività. Essi hanno mostrato una buona competenza anche se sono stati identificati spazi di miglioramento per le prestazioni del metodo e spunti per le attività di training da parte del LNR per *E. coli*.
4. L'attività di tipizzazione molecolare genomica e l'analisi filogenetica deve essere incrementata attraverso la partecipazione di più laboratori a questa specifica attività. La competenza dimostrata dai laboratori partecipanti è risultata tuttavia buona, in particolare nel caso di utilizzo delle metodiche WGS, indipendentemente dal metodo di analisi utilizzato.