



**Risultati del 28° test inter-laboratorio nazionale (PT28)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC) - 2020**

A cura di: *Margherita Montalbano Di Filippo, Silvia Arancia, Arianna Boni, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Guendalina Fornari Luswergh, Federica Gigliucci, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Gaia Scavia, Rosangela Tozzoli, Stefano Morabito*



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.

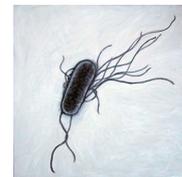
La performance analitica è stata valutata relativamente alla capacità di identificare, con qualunque metodica, almeno i seguenti 13 sierogruppi, selezionati per la loro rilevanza epidemiologica o normativa:

- 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 da Scheutz *et al.*, 2012 o WGS.

4. La capacità di produrre dati di tipizzazione molecolare degli isolati con metodiche “whole genome” e di identificare ceppi correlati filogeneticamente.

L’esercizio è stato condotto su un set di otto ceppi STEC e questo documento rappresenta la valutazione complessiva dello studio inter-laboratorio PT28.



2. PARTECIPANTI

Allo studio hanno aderito 13 laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.

I partecipanti, di seguito elencati nel dettaglio, includevano Laboratori afferenti a 11 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZZSS) e i Laboratori di Prevenzione di due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), rispettivamente della Brianza e di Milano.

- Laboratorio di prevenzione, ATS Brianza, Oggiono (Lecco)
- UOC Laboratorio di Prevenzione ATS della Città Metropolitana di Milano, UOS Microbiologia e Biologia Molecolare, Milano
- 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 Lazio e Toscana, Sicurezza Alimentare – UOT Toscana Nord – Sede Pisa
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Sicurezza e Qualità degli Alimenti, Torino
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, S.S. Microbiologia Molecolare ed Analisi Genomiche, Torino
- IZS della Sicilia, Area Catania
- IZS Umbria e Marche, Centro di Riferimento Patogeni Enterici CRRPE5, Perugia
- IZS Venezia, SCT4 - Sezione di Pordenone, Cordenons (PN)
- IZS Venezia, Sezione di Legnaro (PD)



3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

Otto ceppi di *E. coli* (campioni 1-8), 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” (*True Value*). La **Tabella 1b** riporta i geni di virulenza identificati mediante sequenziamento dell'intero genoma (WGS) presso l'LNR per *E. coli*.

I campioni, preparati il 27 ottobre 2020, erano costituiti da colture batteriche pure seminate per infissione in agar molle (0.3 % agar in terreno nutriente), incubate a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 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 28 ottobre 2020, saggiando sei 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 9 novembre 2020, quando 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.



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

Ceppo	Sierotipo	ST	Geni di virulenza e sottotipo stx		
			stx1	stx2	eae
1	O80:H2	301	-	stx2f	+
2	O80:H2	301	-	stx2a	+
3	O80:H2	301	-	stx2a	+
4	O80:H2	301	-	stx2a	+
5	O80:H2	301	-	stx2a	+
6	O26:H11	21	stx1a	-	+
7	O146:H21	442	stx1c	stx2b	-
8	O104:H7	2283	stx1c	-	-

Tabella 1b. Geni di virulenza identificati mediante WGS

Ceppo	Geni di Virulenza
1	<i>cea, cma, cvaC, eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espP, gad, hlyF, hra, ironN, iss, mchF, nleA, nleB, nleC, ompT, sitA, stx2, tir</i>
2	<i>cma, cvaC, eae, efa1, ehxA, espA, espB, espP, gad, hlyF, iha, ironN, iss, mchB, mchC, mchF, nleA, nleB, nleC, ompT, stx2, sitA, tir</i>
3	<i>cvaC, eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espP, etsC, gad, hlyF, iha, ironN, iss, mchB, mchC, mchF, nleA, nleB, nleC, ompT, sitA, stx2, tir</i>
4	<i>eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espP, gad, hlyF, hra, iha, ironN, iss, mcbA, mchB, mchC, mchF, nleA, nleB, nleC, ompT, sitA, stx2, tir</i>
5	<i>eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espP, gad, hlyF, hra, iha, ironN, iss, mcbA, mchB, mchC, mchF, nleA, nleB, nleC, ompT, sitA, stx2, tir</i>
6	<i>astA, cia, cib, cif, eae, efa1, ehxA, espA, espB, espF, espJ, espP, gad, iha, iss, iucC, iutA, katP, lpfA, nleA, nleB, stx1, terC, tir, toxB, traT</i>
7	<i>cea, ehxA, epeA, espI, focC, gad, iha, ireA, ironN, iss, kpsE, lpfA, mcbA, mchB, mchC, mchF, mcma, sfaD, stx1, stx2, subA, tia</i>
8	<i>aaiC, celB, epeA, gad, ireA, katP, lpfA, neuC, orf3, stx1</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.

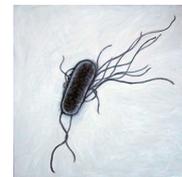
Metodi di analisi per la determinazione di tutte queste caratteristiche sono disponibili anche nel sito web dell'EURL-VTEC. È inoltre presente un protocollo per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* mediante PCR *end-point*, basato sul metodo descritto da Scheutz *et al.* (*J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 2951-63).

Per la partecipazione al PT28, 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 PT28 era l'esecuzione dell'analisi filogenetica degli isolati. 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). In particolare, è stato richiesto 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 di riferimento selezionato dal laboratorio. Al termine dell'analisi filogenetica è stato richiesto di indicare quali ceppi test facessero parte di un cluster.

3.3. Invio dei risultati mediante servizio online

I risultati sono stati inviati utilizzando un form online predisposto dall'EURL per *E. coli*. Le istruzioni ed il collegamento per accedere al form sono stati inviati per E-mail a tutti i partecipanti.



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. Non sono state assegnate penalità a quei laboratori che non hanno identificato il sierogruppo dei ceppi STEC appartenenti al sierogruppo O80 e indicati con (ONT) in quanto al di fuori del campo di applicazione del metodo.
- **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 otto 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.

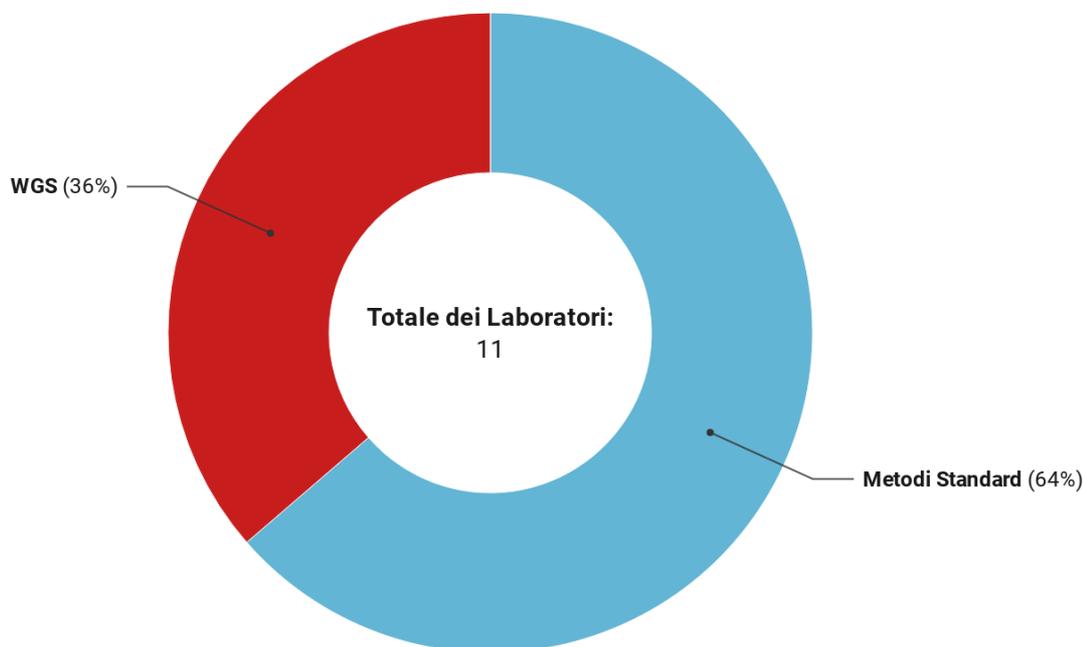


4. RISULTATI

Undici Laboratori hanno sottomesso al LNR *E. coli* i risultati dello studio. Due laboratori (L169 e L498) non hanno sottomesso alcun risultato e sono stati esclusi dalla valutazione. I risultati aggregati dello studio sono riportati nelle **Figure 1 - 4**.

Figura 1: Percentuale dei Laboratori partecipanti suddivisi in base ai metodi utilizzati per caratterizzare gli isolati

In particolare, 7 Laboratori hanno fornito i risultati ottenuti con metodi convenzionali, e 4 laboratori con il metodo basato su WGS



4.1. Identificazione dei geni di virulenza di *E. coli*

I risultati relativi all'identificazione dei geni *stx1*, *stx2* e *eae* sono riportati in **Figura 2**.

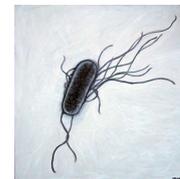
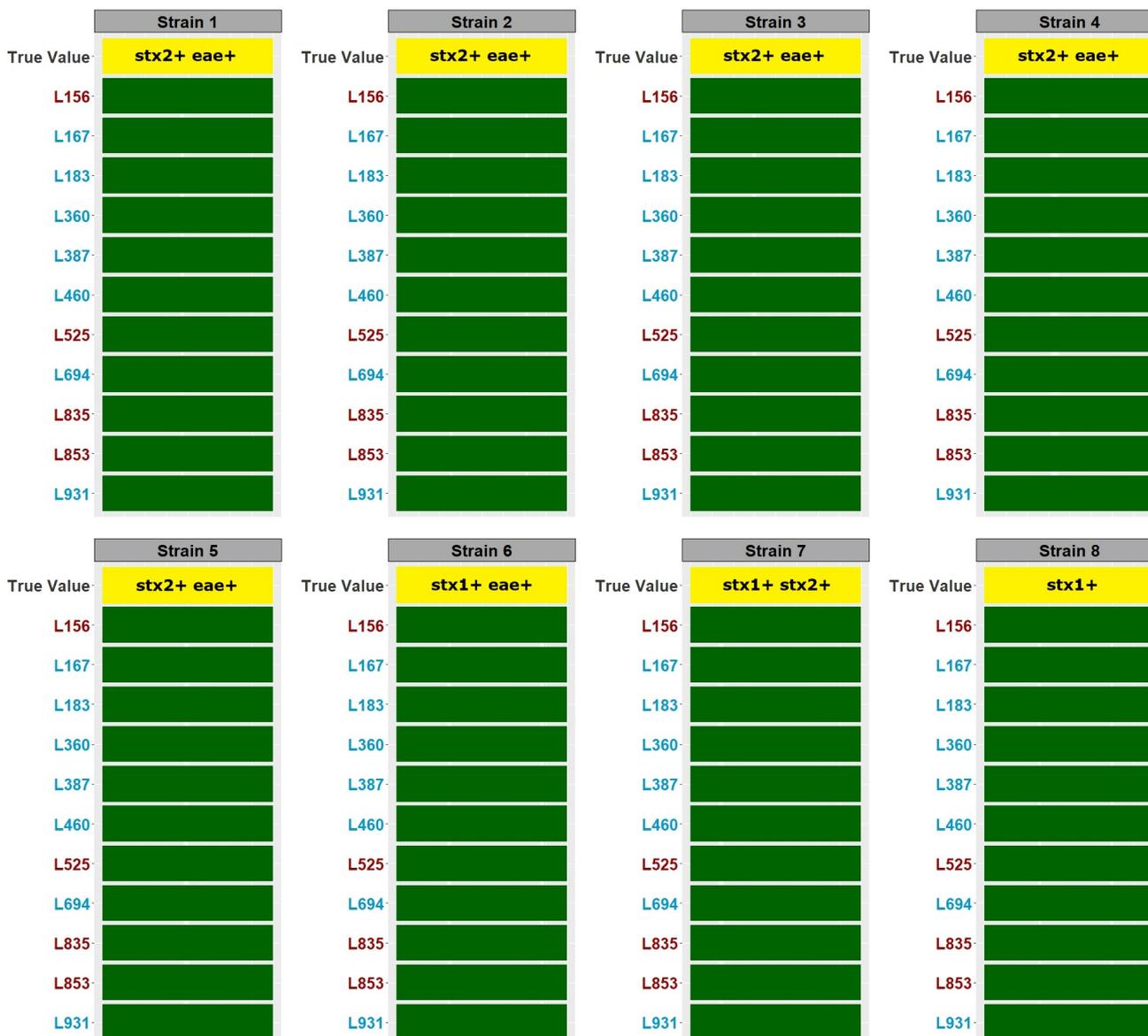


Figura 2. Identificazione dei geni di virulenza di *E. coli*. Le caselle verdi rappresentano i risultati corretti, quelle rosse i risultati non corretti con evidenziate le determinazioni non corrette. Le caselle in giallo corrispondono al gold standard (True Value). I laboratori in blu hanno riportato i risultati ottenuti con i metodi convenzionali, mentre i laboratori in rosso scuro hanno riportato i risultati ottenuti con il metodo WGS.



4.2. Identificazione dei sierogruppi di *E. coli*

I risultati relativi all'identificazione dell'antigene O del sierogruppo sono riportati in **Figura 3**.

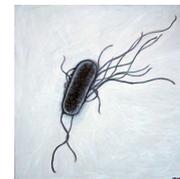


Figura 3. Identificazione dell'antigene O del sierogruppo. Le caselle verdi rappresentano i risultati corretti (ONT quando il sierogruppo non è stato identificato nei campioni), quelle rosse i risultati non corretti con evidenziate le determinazioni non corrette. Le caselle in giallo corrispondono ai gold standards (True Value). I laboratori in blu hanno riportato i risultati ottenuti con i metodi convenzionali, mentre i laboratori in rosso scuro hanno riportato i risultati ottenuti con il metodo WGS.

Strain 1		Strain 2		Strain 3		Strain 4	
True Value	O80:H2						
L156		L156		L156		L156	
L167	ONT	L167	ONT	L167	ONT	L167	ONT
L183	ONT	L183	ONT	L183	ONT	L183	ONT
L360	ONT	L360	ONT	L360	ONT	L360	ONT
L387	ONT	L387	ONT	L387	ONT	L387	ONT
L460	ONT	L460	ONT	L460	ONT	L460	ONT
L525		L525		L525		L525	
L694	ONT	L694	ONT	L694	ONT	L694	ONT
L835		L835		L835		L835	
L853		L853		L853		L853	
L931	ONT	L931	ONT	L931	ONT	L931	ONT

Strain 5		Strain 6		Strain 7		Strain 8	
True Value	O80:H2	True Value	O26:H11	True Value	O146:H21	True Value	O104:H7
L156		L156		L156		L156	
L167	ONT	L167		L167		L167	
L183	ONT	L183		L183		L183	
L360	ONT	L360		L360	ONT	L360	
L387	ONT	L387		L387		L387	
L460	ONT	L460		L460		L460	
L525		L525		L525		L525	
L694	ONT	L694		L694		L694	
L835		L835		L835		L835	ONT
L853		L853		L853		L853	
L931	ONT	L931		L931		L931	

4.3. Identificazione dei sottotipi del gene *stx* di *E. coli*

I risultati relativi alla caratterizzazione dei sottotipi del gene *stx* sono riportati in **Figura 4**.

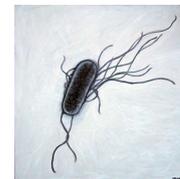
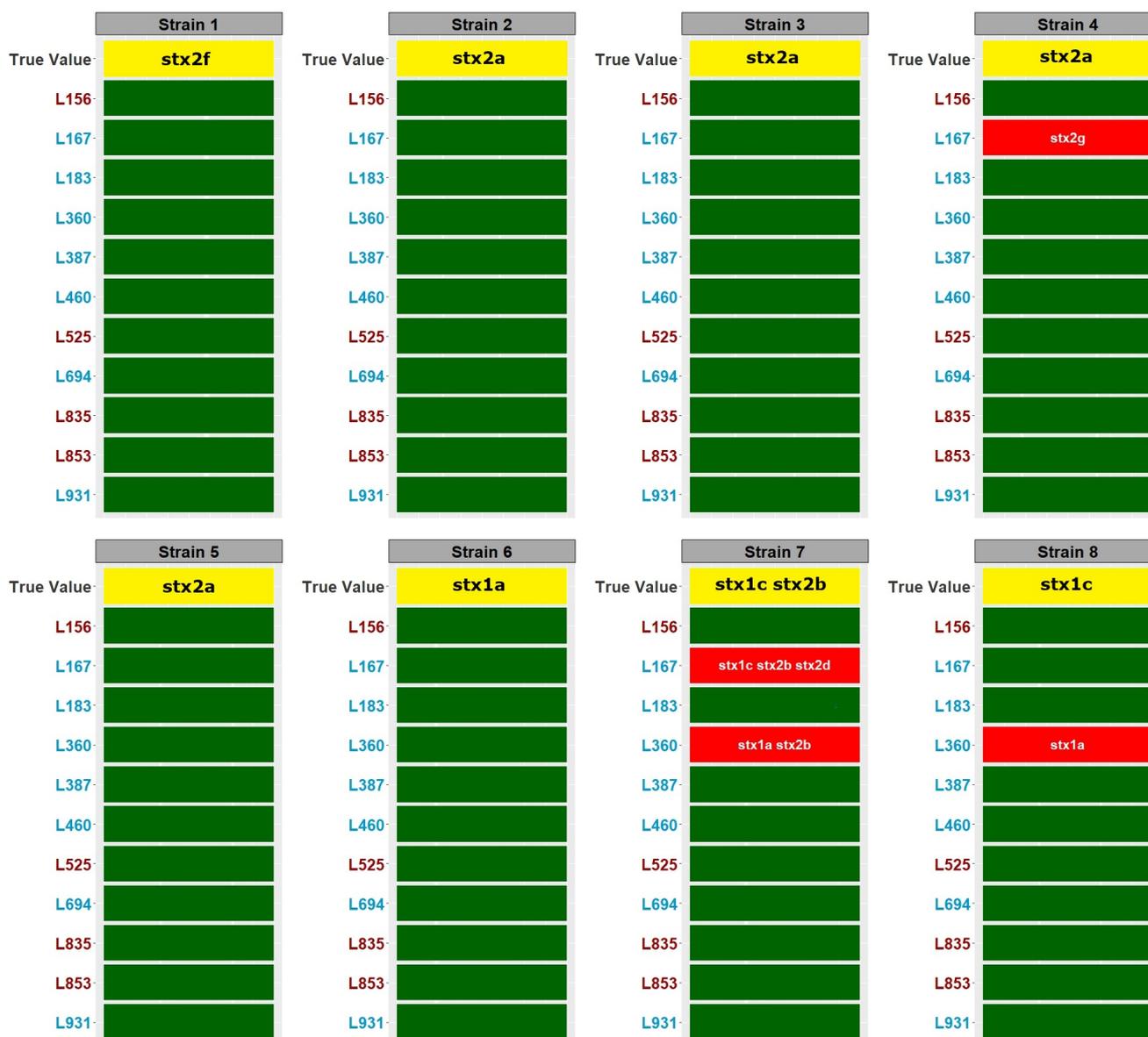
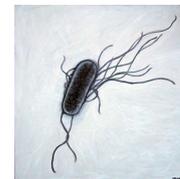


Figura 4. Identificazione dei sottotipi dei geni *stx1* e *stx2*. Le caselle verdi rappresentano i risultati corretti, quelle rosse i risultati non corretti con evidenziate le determinazioni non corrette. Le caselle in giallo corrispondono ai gold standards (True Value). I laboratori in blu hanno riportato i risultati ottenuti con i metodi convenzionali, mentre i laboratori in rosso scuro hanno riportato i risultati ottenuti con il metodo WGS.



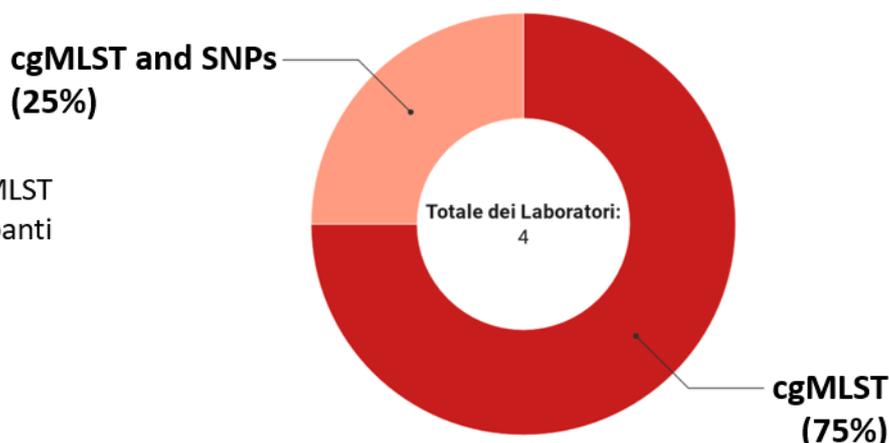


4.4 Cluster Analisi

I risultati relativi alla Cluster analisi sono stati sottomessi da quattro laboratori (L156, L525, L835 e L853) e sono riportati in **Figura 5**. In particolare, solo un laboratorio (L156) ha analizzato i ceppi sia con la metodica di cgMLST sia con l'analisi degli SNPs, tre (L525, L835 e L853) hanno utilizzato la metodica cgMLST (**Figura 5a**).

Nel dettaglio, la **Figura 5b** mostra che la maggior parte dei laboratori non ha identificato l'appartenenza dei soli ceppi 4 e 5 ad un cluster: solo un laboratorio (L835) ha correttamente riportato il ceppo 4 ed il ceppo 5 come parte di un cluster.

Figura 5a: Strategie utilizzate (cgMLST e/o SNPs) dai laboratori partecipanti nella cluster analisi



RISULTATI CLUSTER ANALISI

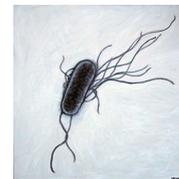
True Value	Appartenenza al Cluster 4 - 5 Differenza in numeri di Alleli = 0	DISTANZE	
		Differenze Alleliche	SNPs
**L156	Appartenenza al Cluster 1 - 2 - 3 - 4 - 5		0-15
L525	Appartenenza al Cluster 3 - 4 - 5	0-9	
L835		0	
L853	Appartenenza al Cluster 1 - 3 - 4 - 5	0-10	

Figura 5b: I risultati ottenuti dai laboratori partecipanti relativi alla cluster analisi.

Le caselle verdi rappresentano i risultati corretti, quelle rosse i risultati non corretti con evidenziate le determinazioni non corrette. Le caselle in giallo corrispondono ai gold standards (True Value).

I laboratori in rosso scuro hanno riportato i risultati ottenuti con la metodica cgMLST, mentre i laboratori in rosa ** hanno riportati i risultati ottenuti sia con cgMLST sia con gli SNPs.

La tabella mostra la tipologia (valori) di distanze utilizzate nell'esercizio della cluster analisi dai laboratori partecipanti.

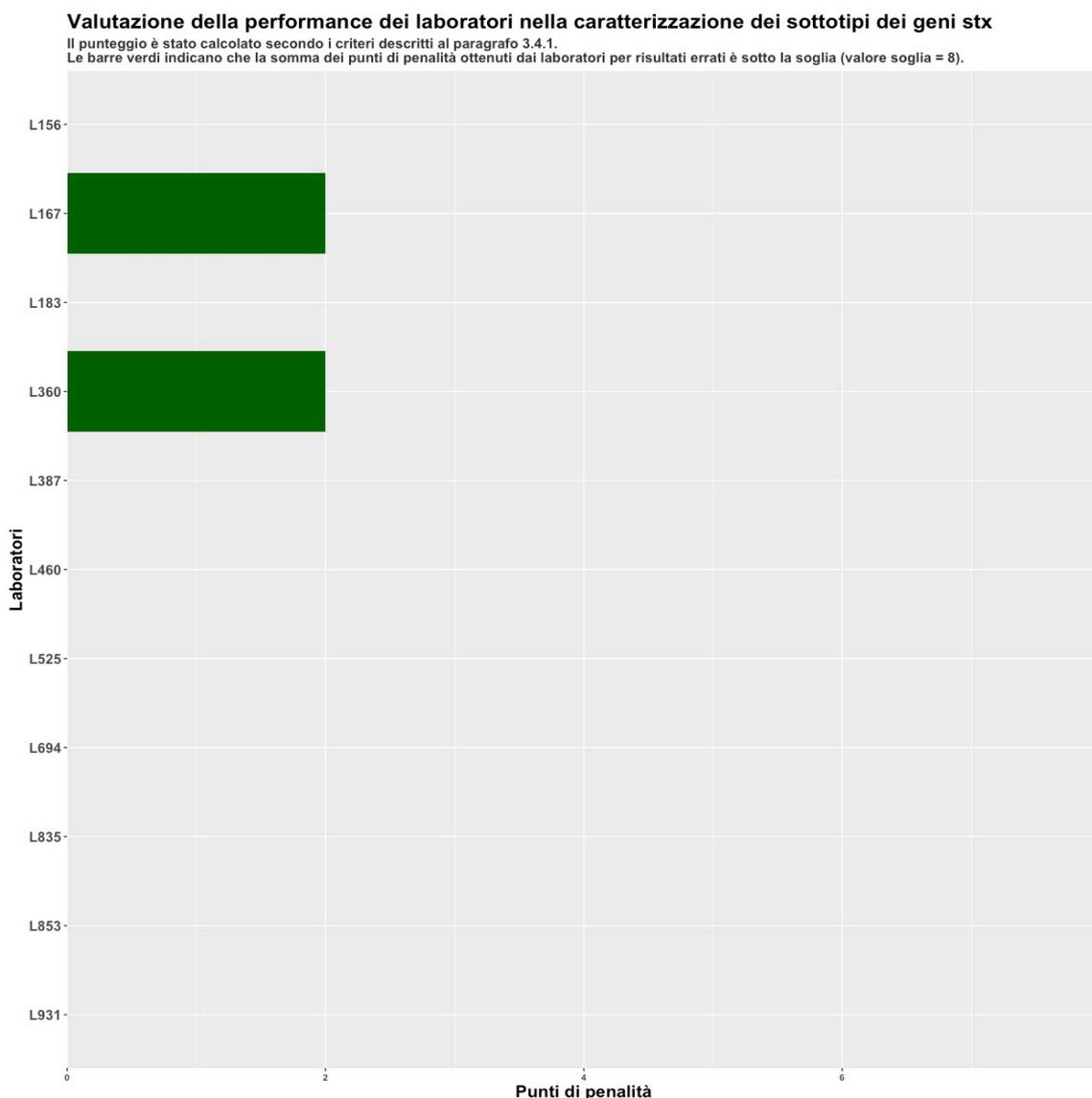


5. Valutazione della competenza dei Laboratori partecipanti

Tutti i laboratori partecipanti hanno mostrato una competenza soddisfacente relativamente all'identificazione dei geni di virulenza dei ceppi STEC (**Figura 2**) e alla determinazione del sierogruppo (**Figura 3**) dei ceppi inviati (nessun punto di penalità assegnato - il calcolo dei punti di penalità è stato effettuato secondo i criteri descritti al paragrafo 3.4.1).

La **Figura 6** mostra invece la valutazione della performance dei laboratori nella caratterizzazione dei sottotipi dei geni *stx*.

Figura 6





CONSIDERAZIONI FINALI

1. Tredici laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno accettato di partecipare allo studio. Undici hanno partecipato attivamente e riportato i risultati attraverso il servizio online. La partecipazione al circuito è stata considerata positivamente considerando anche il periodo di pandemia da COVID-19.
2. Tutti i Laboratori partecipanti hanno mostrato un'ottima competenza relativamente all'identificazione dei geni di virulenza dei ceppi STEC e alla determinazione del sierogruppo dei ceppi inviati, ottenendo 0 punti di penalità.
3. L'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* è stata effettuata da tutti i laboratori con esito soddisfacente. 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 senz'altro da migliorare.