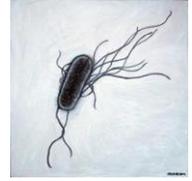


**Risultati del 31° test inter-laboratorio nazionale (PT31)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC) - 2021**

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



1. STRUTTURA E OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio interlaboratorio PT31 è stato organizzato con l'obiettivo di valutare la competenza degli laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti nella:

1. Identificazione dei principali geni di virulenza STEC (geni *stx1*, *stx2* ed *eae*).
2. Determinazione di alcuni sierogruppi STEC rilevanti per la sanità pubblica (almeno i 14 sierogruppi indicati nel metodo EURL-VTEC_003).
3. Sottotipizzazione dei geni codificanti le tossine Shiga (Stx).
4. Identificazione di cluster di isolati mediante l'analisi genomica.

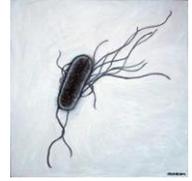
Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione di questo studio.

2. DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio è stato organizzato secondo la norma internazionale ISO/IEC 17043:2010 "Valutazione della conformità – Requisiti generali per le prove valutative".

Il PT31 è stato condotto su un set di otto ceppi STEC e consisteva nelle seguenti tre sezioni obbligatorie:

1. L'identificazione dei principali geni di virulenza mediante amplificazione PCR. Ai partecipanti è stato chiesto di rilevare i seguenti geni:
 - ✓ *stx1*, *stx2* e il gene *eae* codificante l'intimina.
2. Determinazione dei sierogruppi dei ceppi. Ai partecipanti è stato chiesto di identificare il sierogruppo dei ceppi di test analizzando almeno i seguenti 14 sierogruppi, selezionati in base alla loro importanza epidemiologica o normativa:
 - ✓ O26, O103, O111, O145 e O157: i primi 5 sierogruppi STEC, più coinvolti in gravi infezioni umane a livello mondiale.
 - ✓ O45 e O121: epidemiologicamente rilevanti e considerati adulteranti nella carne bovina negli USA.
 - ✓ O104: rilevante dopo l'epidemia tedesca del 2011.
 - ✓ O55, O80, O91, O113, O128 e O146: selezionati sulla base alla loro prevalenza nelle infezioni umane in Europa negli ultimi anni, secondo i dati raccolti dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC).



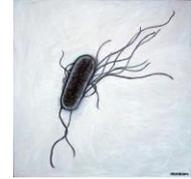
3. Sottotipizzazione dei geni *stx*. Ai partecipanti è stato chiesto di identificare i sottotipi del gene *stx1* (*stx1a*, *stx1c* e *stx1d*) e del gene *stx2* (da *stx2a* a *stx2g*).

In aggiunta alle caratterizzazioni indicate, è stato incluso nel disegno dello studio un esercizio, su base volontaria, consistente nel confronto dei genomi degli isolati test con lo scopo di identificare quelli raggruppabili in un cluster mediante valutazione delle differenze alleliche o nucleotidiche. Nel dettaglio, ai partecipanti è stato chiesto di caratterizzare gli isolati mediante sequenziamento dell'intero genoma (WGS) e di determinarne il grado di correlazione utilizzando metodi basati su cgMLST o SNPs.

3. PARTECIPANTI

Allo studio hanno aderito i 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) di seguito elencati:

- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", 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, Roma
- IZS Lazio e Toscana, Sicurezza Alimentare – UOT Toscana Nord – Sede Pisa
- IZS del Mezzogiorno, Sezione di Catanzaro
- 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 Umbria e Marche, Sezione di Perugia
- IZS Venezie, Sezione di Legnaro (PD)



4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

Otto ceppi STEC (ceppi test da 1 a 8), sono stati selezionati tra quelli presenti nelle collezioni batteriche del LNR per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, e verificati per la presenza di tutte le caratteristiche genetiche e/o fenotipiche richieste prima dell'invio ai laboratori partecipanti.

Le caratteristiche dei ceppi determinate dall'LNR per *E. Coli*, e riportate nella Tabella 1 (1a e 1b) sono state considerate risultati di riferimento. La tabella 1b riporta i geni di virulenza identificati tramite WGS presso l'LNR per *E. coli*

I ceppi test sono stati preparati il 3 Novembre 2021, come colture batteriche fresche seminate in agar molle (0.3 % agar in terreno nutriente), in fiale di vetro borosilicato. Dati precedentemente prodotti presso il Laboratorio Nazionale ed Europeo di Riferimento per *E. coli* indicano, per queste preparazioni di ceppi batterici, una stabilità di oltre un mese. Le colture sono state incubate per 18 ore a 37 °C ± 1 °C ed etichettate con codici numerici generati casualmente (3 o 4 cifre), diversi per ciascuna serie di ceppi inviati ai laboratori partecipanti. Il controllo di omogeneità è stato eseguito il 4 Novembre 2021 su cinque set di ceppi test selezionati casualmente. I restanti campioni di prova sono stati conservati a temperatura ambiente fino all'8 Novembre 2021, quando i pacchi sono stati spediti ai laboratori partecipanti tramite corriere.

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

ID PT31	Sierotipo	Profilo dei geni di virulenza	Sottotipo <i>stx1</i>	Sottotipo <i>stx2</i>
Ceppo test 1	O111:H8	<i>stx1+</i> <i>stx2+</i> <i>eae+</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>
Ceppo test 2	O111:H8	<i>stx1+</i> <i>stx2+</i> <i>eae+</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>
Ceppo test 3	O111:H8	<i>stx2+</i> <i>eae+</i>	-	<i>stx2a</i>
Ceppo test 4	O111:H8	<i>stx1+</i> <i>stx2+</i> <i>eae+</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>
Ceppo test 5	O145:H28	<i>stx1-</i> <i>stx2+</i> <i>eae+</i>	-	<i>stx2a</i>
Ceppo test 6	O26:H11	<i>stx1+</i> <i>stx2+</i> <i>eae+</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>
Ceppo test 7	O113:H4	<i>stx1+</i> <i>stx2+</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2d</i>
Ceppo test 8	O174:H21	<i>stx2+</i>	-	<i>stx2c</i>



Tabella 1b. Geni di virulenza identificati mediante WGS

ID PT31	Virulotipo	ST
Ceppo test 1	<i>astA;celB;cif;efa1;espA;espF;espJ;gad;iha;iucC;iutA;lpfA;nleA;nleB;nleC;terC;tir;traT</i>	ST16
Ceppo test 2	<i>astA;celB;cif;efa1;espA;espF;espJ;gad;iha;iucC;iutA;lpfA;nleA;nleB;nleC;terC;tir;traT</i>	ST16
Ceppo test 3	<i>astA;cif;efa1;ehxA;espA;espF;espJ;gad;iha;iss;iucC;iutA;lpfA;nleA;nleB;nleC;terC;tir;traT</i>	ST16
Ceppo test 4	<i>astA;celB;cif;efa1;ehxA;espA;espF;espJ;gad;iha;iss;lpfA;nleA;nleB;nleC;tccP;terC;tir;traT</i>	ST16
Ceppo test 5	<i>astA;chuA;cif;ehxA;espA;espB;espl;espJ;espP;gad;iha;iss;neuC;nleA;nleB;nleC;senB;terC; tir;toxB;traT;vat</i>	ST32
Ceppo test 6	<i>astA;celB;cif;efa1;ehxA;espA;espB;espF;espJ;espP;gad;iha;iss;iucC;katP;lpfA;nleA;nleB;nleC;tccP;terC;tir;toxB;traT</i>	ST21
Ceppo test 7	<i>celB;espl;gad;iha;iss;papC;terC;tia</i>	ST10
Ceppo test 8	<i>cea;ehxA;espl;espP;gad;iha;iss;lpfA;papC;saa;subA;terC;tia;traT</i>	ST677

4.2. Metodi di laboratorio

Ai laboratori è stato chiesto di identificare i principali geni di virulenza utilizzando qualsiasi metodo applicato nei test di routine, incluso il sequenziamento WGS.

Metodi per poter eseguire tutte le determinazioni erano anche disponibili sul sito web dell'EURL-VTEC.

Per quanto concerne l'esercizio volontario sull'analisi filogenetica degli isolati, i partecipanti potevano indicare la correlazione tra i ceppi test mediante analisi SNPs/wg/cgMLST. In particolare, i laboratori dovevano indicare quali ceppi formavano un cluster e riportare il range di SNP o differenze alleliche osservato all'interno del cluster.

4.3. 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.



4.4. Analisi dei risultati

4.4.1 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 14 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 O174 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.

La soglia di **otto punti** di penalità è stata fissata per definire una performance non adeguata.

5. RISULTATI

Tutti i laboratori partecipanti hanno presentato risultati. La Figura 1 mostra il numero di laboratori partecipanti aggregato secondo i metodi utilizzati per caratterizzare gli isolati.

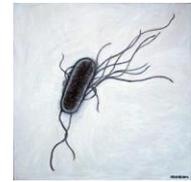
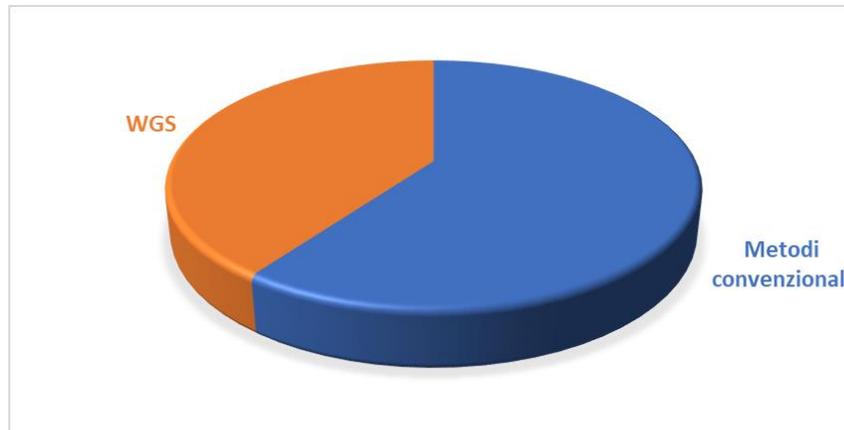


Figura 1. Laboratori partecipanti suddivisi per metodo di caratterizzazione utilizzato



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

I risultati relativi alla caratterizzazione dei ceppi riportati da ciascun laboratorio sono mostrati nelle tabelle sottostanti. I risultati non corretti sono evidenziati in rosso.

Tabella 2a. Caratterizzazione del ceppo test 1

Ceppo 1	Geni di virulenza (<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L259	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i>	1	
L422	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L473	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L571	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	2	
L624	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L702	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L821	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L909	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L941	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	



Tabella 2b. Caratterizzazione del ceppo test 2

Ceppo 2	Geni di virulenza (<i>stx1; stx2; eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx1a;stx2a</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L259	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:, 091	<i>stx1a</i>	1	
L422	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L473	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L571	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L624	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L702	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L821	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L909	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L941	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111	<i>stx1a;stx2a</i>	0	

Tabella 2c. Caratterizzazione del ceppo test 3

Ceppo 3	Geni di virulenza (<i>stx1; stx2; eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx2a</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx2;eae</i>	O111	<i>stx2a</i>	0	
L259	<i>stx1;stx2;eae</i>	O111:, O121	<i>stx1a</i>	5	
L422	<i>stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx2a</i>	0	*
L473	<i>stx2;eae</i>	O111	<i>stx2a</i>	0	
L571	<i>stx2;eae</i>	O111	<i>stx2a</i>	0	
L624	<i>stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx2a</i>	0	*
L702	<i>stx2;eae</i>	O111	<i>stx2a</i>	0	
L821	<i>stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx2a</i>	0	*
L909	<i>stx2;eae</i>	O111:H8	<i>stx2a</i>	0	*
L941	<i>stx2;eae</i>	O111	<i>stx2a</i>	0	



Tabella 2d. Caratterizzazione del ceppo test 4

Ceppo 4	Geni di virulenza (<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L259	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O11; O45	<i>stx1a</i>	3	
L422	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L473	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L571	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L624	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L702	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	
L821	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2b</i>	1	*
L909	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111:H8	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	*
L941	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O111	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0	

Tabella 2e. Caratterizzazione del ceppo test 5

Ceppo 5	Geni di virulenza (<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145:H28	<i>stx2a</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145	<i>stx2a</i>	0	
L259	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145:, O146	<i>stx1a</i>	5	
L422	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145:H28	<i>stx2a</i>	0	*
L473	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145	<i>stx2a</i>	0	
L571	<i>stx2</i>	O145	<i>stx2a</i>	2	
L624	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145:H28	<i>stx2a</i>	0	*
L702	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145	<i>stx2a</i>	0	
L821	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145:H28	<i>stx2a</i>	0	*
L909	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145:H28	<i>stx2a</i>	0	*
L941	<i>stx2</i> ; <i>eae</i>	O145	<i>stx2a</i>	0	

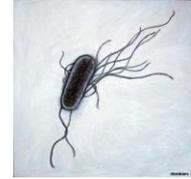


Tabella 2f. Caratterizzazione del ceppo test 6

Ceppo 6	Geni di virulenza (<i>stx1; stx2; eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26:H11	<i>stx1a;stx2a</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L259	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26:, O55	<i>stx1a</i>	1	
L422	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26:H11	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L473	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L571	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L624	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26:H11	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L702	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26	<i>stx1a;stx2a</i>	0	
L821	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26:H11	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L909	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26:H11	<i>stx1a;stx2a</i>	0	*
L941	<i>stx1;stx2;eae</i>	O26	<i>stx1a;stx2a</i>	0	

Tabella 2g. Caratterizzazione del ceppo test 7

Ceppo 7	Geni di virulenza (<i>stx1; stx2; eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx1;stx2</i>	O113:H4	<i>stx1a;stx2d</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx1;stx2</i>	O113	<i>stx1a;stx2d</i>	0	
L259	<i>stx1;stx2</i>	N.A.	<i>stx1a</i>	2	
L422	<i>stx1;stx2</i>	O113:H4	<i>stx1a;stx2d</i>	0	*
L473	<i>stx1;stx2</i>	O113	<i>stx1a;stx2d</i>	0	
L571	<i>stx1;stx2;eae</i>	O113	<i>stx1a;stx2d</i>	2	
L624	<i>stx1;stx2</i>	O113:H4	<i>stx1a;stx2c;stx2d</i>	1	*
L702	<i>stx1;stx2</i>	O113	<i>stx1a;stx2c;stx2d</i>	1	
L821	<i>stx1;stx2</i>	O113:H4	<i>stx1a;stx2d</i>	0	*
L909	<i>stx1;stx2</i>	O113:H4	<i>stx1a;stx2d</i>	0	*
L941	<i>stx1;stx2</i>	O113	<i>stx1a;stx2c;stx2d</i>	1	



Tabella 2h. Caratterizzazione del ceppo test 8

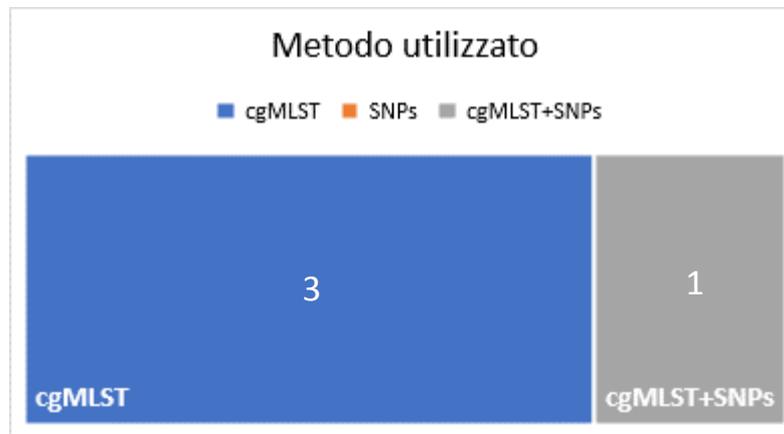
Ceppo 8	Geni di virulenza (<i>stx1</i> ; <i>stx2</i> ; <i>eae</i>)	Sierogruppo/sierotipo	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità	WGS
Risultato atteso	<i>stx2</i>	O174:H21	<i>stx2c</i>		
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	Risultato riportato		
L162	<i>stx2</i>	ONT	<i>stx2c</i>	0	
L259	<i>stx1;stx2</i>	ONT	<i>stx1a</i>	5	
L422	<i>stx2</i>	O174:H21	<i>stx2c</i>	0	*
L473	<i>stx2</i>	ONT	<i>stx2c</i>	0	
L571	<i>stx2;eae</i>	O80	<i>stx2c</i>	4	
L624	<i>stx2</i>	O174:H21	<i>stx2a;stx2c</i>	1	*
L702	<i>stx2</i>	ONT	<i>stx2d;stx2c</i>	1	
L821	<i>stx2</i>	O-:H21	<i>stx2c</i>	0	*
L909	<i>stx2</i>	O174:H21	<i>stx2c</i>	0	*
L941	<i>stx2</i>	O104	<i>stx2c</i>	2	

5.4 Analisi filogenetica

I risultati relativi alla Cluster analisi sono stati sottomessi da tutti i laboratori che hanno effettuato il WGS (L422, L624, L821 e L909). Come mostrato nella Figura 2, l'analisi filogenetica è stata condotta essenzialmente tramite analisi del genoma "core" (core genome MLST, cgMLST), in un caso in parallelo all'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs).



Figura 2. Strategie utilizzate dai laboratori partecipanti per l'analisi filogenetica



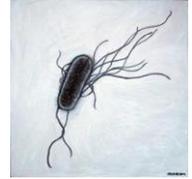
Nella tabella sottostante sono riportati i risultati ottenuti e l'interpretazione effettuata dai laboratori partecipanti. Tutti i laboratori hanno individuato correttamente il cluster formato dai ceppi test 1 e 2.

Tabella 3. Risultati dell'analisi filogenetica

Code	Risultato atteso (ceppi che formano un cluster-1;2;3;4;5;6;7;8): Yes;Yes;No;No;No;No;No;No	Distanza	Metodo
L422	Yes;Yes;No;No;No;No;No;No	<7 allelic differences, 1 SNP	cgMLST; SNP
L624	Yes;Yes;No;No;No;No;No;No	0	cgMLST
L821	Yes;Yes;No;No;No;No;No;No	0 allelic differences	cgMLST
L909	Yes;Yes;No;No;No;No;No;No	0-5 allelic differences	cgMLST

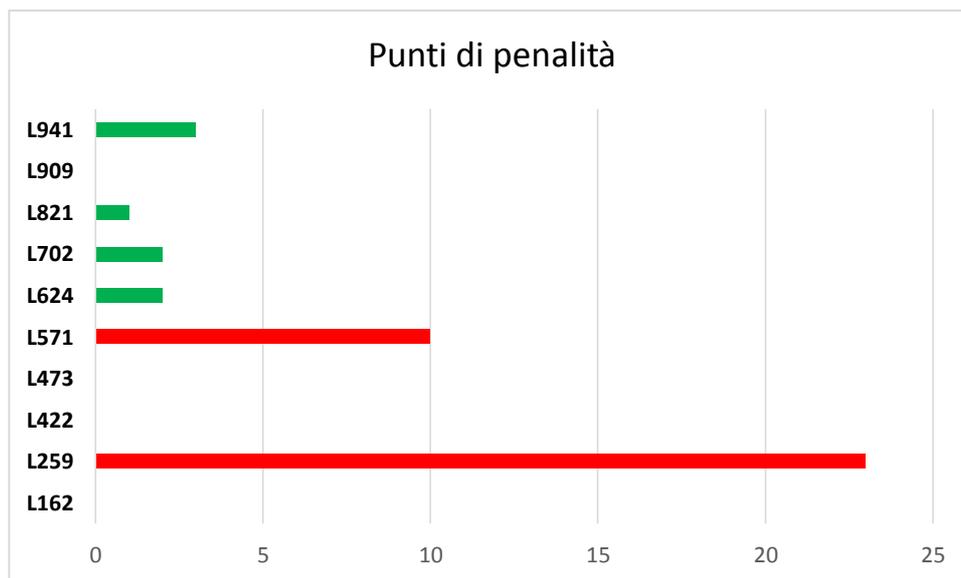
6. VALUTAZIONE DELLA COMPETENZA DEI LABORATORI PARTECIPANTI

Solo due laboratori hanno mostrato una competenza non soddisfacente (Figura 3). I punti di penalità assegnati a questi due laboratori riguardavano sia l'identificazione di geni di virulenza che di sottotipi dei geni *stx*, e in alcuni casi anche la determinazione del sierogruppo. I laboratori che hanno mostrato prestazioni non soddisfacenti saranno sottoposti a follow up secondo la procedura sviluppata dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli*



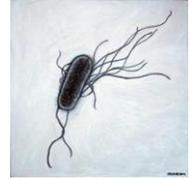
(https://www.iss.it/documents/5430402/0/Evaluation+underperformance+NRLs_rev5.pdf/71cc297d-57a8-700f-5b73-f0aca0c66290?t=1625066578747).

Figura 3. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante



7. CONSIDERAZIONI FINALI

1. Dieci laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito allo studio. La partecipazione al circuito è stata considerata positivamente considerando anche il periodo di pandemia da COVID-19.
2. La maggior parte dei Laboratori partecipanti ha mostrato un'ottima competenza 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, anche se i risultati riportati evidenziano alcune lacune, che verranno gestite mediante la collaborazione dell'LNR per *E. coli*.
4. I laboratori che hanno utilizzato metodi di tipizzazione basati sul WGS hanno mostrato una migliore prestazione nella determinazione del sottotipo dei geni *stx*.



-
5. L'attività di tipizzazione molecolare genomica e l'analisi filogenetica deve essere incrementata attraverso la partecipazione di più laboratori a questa specifica attività. Tuttavia, la competenza dimostrata dai laboratori partecipanti è senza dubbio soddisfacente.