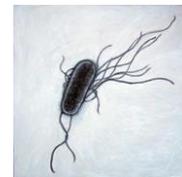




**Risultati del 35° test inter-laboratorio nazionale (PT35)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC) ed altri *E. coli*
diarreagenici– 2022-2023**

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



1. STRUTTURA E OBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi del PT35 erano valutare la competenza laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti nella:

1. L'identificazione dei principali geni di virulenza STEC (geni *eae* e *stx*).
2. L'identificazione dei 14 sierogruppi STEC indicati nell'EURL-VTEC_Method_003.
3. L'identificazione della presenza dei geni di virulenza che caratterizzano altri gruppi di *E. coli* patogeni (*ipaH* per EIEC, *st* e *lt* per ETEC, *aggR* e *aaiC* per EAEC).
4. La sottotipizzazione dei geni codificanti per le Shiga Tossine (Stx).
5. L'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 in accordo con le prescrizioni generali della norma internazionale ISO/IEC 17043:2010 "Valutazione della conformità – Requisiti generali per le prove valutative".

Il materiale di prova era costituito da otto ceppi di *E. coli* isolati in purezza e lo studio era articolato in quattro moduli analitici obbligatori per tutti i partecipanti:

1. L'identificazione dei principali geni di virulenza dei ceppi STEC, *stx1*, *stx2* e il gene *eae*, mediante amplificazione PCR.
2. L'identificazione di geni di virulenza associati ad altri patotipi di *E. coli* diarroeogenici (DEC), ed in particolare i geni *ipaH* (EIEC), *st* e *lt* (ETEC), *aggR* e *aaiC* (EAEC).
3. La determinazione del sierogruppo dei ceppi test. Quest'ultimo modulo era principalmente rivolto all'identificazione dei 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).

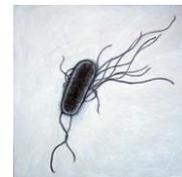
3. Sottotipizzazione dei geni *stx*. Ai partecipanti è stato chiesto di identificare i sottotipi del gene *stx1* (*stx1a*, *stx1c* e *stx1d*) e del gene *stx2* (da *stx2a* a *stx2g*).

Le determinazioni analitiche potevano essere eseguite utilizzando qualunque metodica in uso nel laboratorio, incluse metodiche NGS, o i metodi indicati dal laboratorio di riferimento e pubblicati sul sito web del Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* alla sezione "Laboratory Methods" (<https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>). In aggiunta alle determinazioni obbligatorie, 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 appartenenti ad un cluster genomico mediante valutazione delle differenze alleliche (cgMLST) o dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP).

3. PARTECIPANTI

Allo studio hanno aderito in totale 13 laboratori, 12 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZZSS) ed una Azienda per la tutela della salute (ATS), di seguito elencati:

- ATS Milano Città Metropolitana - Laboratorio di Prevenzione, Milano
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Sezione di Genova
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - SC Biotecnologie applicate e Produzioni, Torino
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "Area Catania", Catania, Italy
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede territoriale di Bologna
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - UOS Biotecnologie applicate alla diagnostica, Portici



- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - UOS Genetica, Genomica e Bioinformatica, Portici
- 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 Venezia, Sezione di Legnaro (PD)
- IZS Venezia, Sezione di Cordenons (PN)

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

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

La tabella 1b riporta gli ulteriori geni di virulenza identificati tramite sequenziamento dell'intero genoma (whole genome sequencing, WGS) presso il LNR per *E. coli*

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

ID PT35	Sierotipo	MLST	Profilo dei geni di virulenza	Sottotipo <i>stx1</i>	Sottotipo <i>stx2</i>	Cluster
1	O26:H11	ST21	<i>eae stx2</i>	-	<i>stx2a</i>	Sì
2	O26:H11	ST21	<i>eae stx2</i>	-	<i>stx2a</i>	Sì
3	O111:H21	ST40	<i>aaiC aggR</i>	-	-	No
4	O26:H11	ST396	<i>eae stx2</i>	-	<i>stx2d</i>	No
5	O187:H28	ST200	<i>stp (=sta1) stx2</i>	-	<i>stx2g</i>	No
6	O104:H7	ST2283	<i>stx1 aaiC*</i>	<i>stx1c</i>	-	No
7	O124:H30	ST6	<i>ipaH</i>	-	-	No
8	O26:H11	ST21	<i>eae stx2</i>	-	<i>stx2a</i>	Sì

* La variante allelica del gene *aaiC* presente in questo ceppo non è rilevata dal metodo "Detection of Enteraggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes" (available at: https://www.iss.it/documents/20126/0/EURL-VTEC_Method_05_Rev+2.pdf)

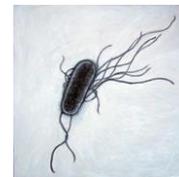


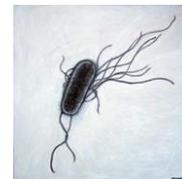
Table 1b: Geni di virulenza identificati nei ceppi test tramite analisi WGS

ID PT35	Virulotipo
Ceppo 1	<i>asta, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, katp, lpfa, nlea, nleb, nlec, terc, tir, toxb, trat</i>
Ceppo 2	<i>asta, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, katp, lpfa, nlea, nleb, nlec, terc, tir, toxb, trat</i>
Ceppo 3	<i>aap, aar, aata, afad, agg3b, agg3c, agg3d, agg5a, asta, espi, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, ompt, orf3, orf4, pic, sat, sepa, terc</i>
Ceppo 4	<i>asta, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, fyua, gad, iha, iss, lpfa, nlea, nleb, nlec, terc, tir, toxb, trat</i>
Ceppo 5	<i>asta, celb, ehxa, gad, lpfa, terc, trat</i>
Ceppo 6	<i>cba, celb, cia, epea, gad, irea, katp, lpfa, neuc, orf3, orf4, terc, trat</i>
Ceppo 7	<i>capu, fyua, gad, iha, ipad, iucc, iuta, pic, senb, siga, sita, terc, trat, virf</i>
Ceppo 8	<i>asta, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, katp, lpfa, nlea, nleb, nlec, terc, tir, toxb, trat</i>

I ceppi test sono stati preparati il 16 Novembre 2022, come colture batteriche fresche da colture stock mantenute in vapori azoto liquido. Le colture resuscitate sono state verificate e controllate per le caratteristiche di riferimento (tabella 1a) e 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 18 Novembre 2022 su sei set di ceppi test selezionati casualmente. I restanti campioni di prova sono stati conservati a temperatura ambiente fino al 24 Novembre 2022, quando i pacchi sono stati spediti ai laboratori partecipanti tramite corriere.

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.



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 formulario online

I risultati sono stati inviati utilizzando un formulario online predisposto dal LNR per *E. coli*. Le istruzioni ed il collegamento per accedere al formulario sono stati inviati per E-mail a tutti i partecipanti. La scadenza per riportare i risultati era il 23 Gennaio 2023, data oltre la quale non era più possibile accedere al formulario.

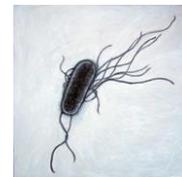
4.4 Valutazione della performance dei laboratori

La competenza dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni determinazione errata 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 *stx1* ed *stx2*.
- **2 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione dei geni *eae*, *ipaH*, *aggR*, *aaiC*, *lt* ed *st*.

Non sono stati assegnati punti di penalità alla mancata identificazione del gene *aaiC* nel ceppo 6 poiché la variante allelica del gene *aaiC* presente in questo ceppo non è rilevata utilizzando diversi metodi basati sulla PCR compreso il metodo "Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes" (https://www.iss.it/documents/20126/0/EURL-VTEC_Method_05_Rev+2.pdf)

- **2 punti** per errori nella determinazione dei 14 sierogruppi indicati nel paragrafo 4.2 o dei relativi geni. Non sono state assegnate penalità a quei laboratori che riportano ONT per la determinazione del sierogruppo dei ceppi 5 e 7 in quanto cadevano al di fuori del campo di applicazione del metodo (O187 e O174, rispettivamente). I punti di penalità sono invece stati assegnati a quei laboratori che hanno indicato sierogruppi diversi da quelli attesi per questi due isolati.



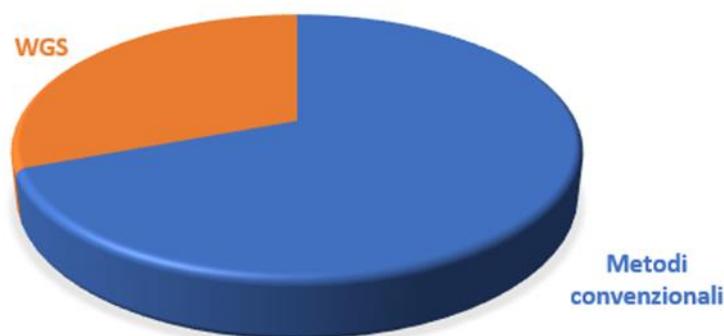
- **1 punto** per ogni risultato riguardante l'identificazione dei sierogruppi, riportato come "Not Done" o "Null".
- **1 punto** per ogni risultato errato o mancante per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*.

La somma dei punti di penalità ottenuti è stata usata per valutare la competenza dei laboratori, considerando una soglia di **otto punti** di penalità per definire una competenza non adeguata.

5. RISULTATI

Tutti i laboratori partecipanti hanno riportato i 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 tipologia di metodo analitico



Quattro laboratori hanno caratterizzato gli isolati mediante WGS: L009, L013, L831 ed L909.

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 seguenti. Per ogni ceppo test vengono presentate due tabelle di risultati: la prima è relativa alla identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e alla determinazione del sierogruppo. La seconda tabella riporta invece i risultati relativi alla sottotipizzazione dei geni *stx* e identificazione dei geni caratteristici degli altri patotipi DEC oggetto dello studio. I



Laboratorio Nazionale di Riferimento per *E. coli*
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare
Istituto Superiore di Sanità



risultati non corretti, che hanno portato all'assegnazione di punti di penalità, sono evidenziati in rosso.



Tabella 2a. Caratterizzazione del ceppo test 1 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 1	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L010	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L011	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L012	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L013	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L422	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L501	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L831	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L909	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L989	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L990	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	Non eseguito	2
L996	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	wzx O26	0
L997	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0

Tabella 2b. Caratterizzazione del ceppo test 1 – identificazione di geni di virulenza di altri patotipi DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 1	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	-	<i>stx2a</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	<i>stx2a</i>	0
L010	-	-	1
L011	-	-	1
L012	-	-	1
L013	-	<i>stx2a</i>	0
L422	-	<i>stx2a</i>	0
L501	-	<i>stx2a</i>	0
L831	-	<i>stx2a</i>	0
L909	-	<i>stx2a</i>	0
L989	-	<i>stx2a</i>	0
L990	-	-	1
L996	-	-	1
L997	-	<i>stx2a</i>	0

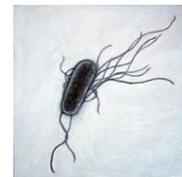


Tabella 2c. Caratterizzazione del ceppo test 2 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 2	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L010	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L011	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L012	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L013	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L422	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L501	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L831	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L909	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L989	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L990	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	Non eseguito	2
L996	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	wzx O26	0
L997	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0

Tabella 2d. Caratterizzazione del ceppo test 2 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 2	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	-	<i>stx2a</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	<i>stx2a</i>	0
L010	-	-	1
L011	-	-	1
L012	-	-	1
L013	-	<i>stx2a</i>	0
L422	-	<i>stx2a</i>	0
L501	-	<i>stx2a</i>	0
L831	-	<i>stx2b</i>	1
L909	-	<i>stx2a</i>	0
L989	-	<i>stx2a</i>	0
L990	-	-	1
L996	-	-	1
L997	-	<i>stx2a</i>	0

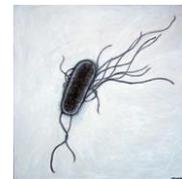


Tabella 2e. Caratterizzazione del ceppo test 3 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 3	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	-	O111:H21	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	O111:H21	0
L010	<i>eae</i>	O111	2
L011	<i>eae</i>	O111	2
L012	-	Non eseguito	2
L013	-	O111:H21	0
L422	-	O111	0
L501	-	O111	0
L831	-	O111:H21	2
L909	-	O111:H21	0
L989	-	Non determinato	2
L990	-	Non eseguito	2
L996	-	O111	0
L997	-	O111	0

Tabella 2f. Caratterizzazione del ceppo test 3 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 3	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	-	2
L010	-	-	2
L011	-	-	2
L012	-	-	2
L013	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0
L422	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0
L501	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0
L831	<i>aaiC</i>	-	2
L909	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0
L989	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0
L990	-	-	2
L996	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0
L997	<i>aaiC</i> ; <i>aggR</i>	-	0

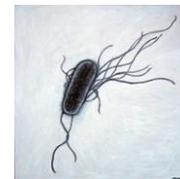


Tabella 2g. Caratterizzazione del ceppo test 4 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 4	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L010	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O111	2
L011	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	1
L012	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	1
L013	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L422	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	1
L501	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	1
L831	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O?:H11	2
L909	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L989	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L990	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	Non eseguito	2
L996	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	wzx O26	1
L997	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	1

Tabella 2h. Caratterizzazione del ceppo test 4 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 4	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	-	<i>stx2d</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	<i>stx2d</i>	0
L010	-	-	1
L011	-	-	1
L012	-	-	1
L013	-	<i>stx2d</i>	0
L422	-	<i>stx2c</i> ; <i>stx2d</i>	1
L501	-	<i>stx2c</i> ; <i>stx2d</i>	1
L831	-	<i>stx2a</i> ; <i>stx2b</i>	1
L909	-	-	1
L989	-	<i>stx2d</i>	0
L990	-	-	1
L996	-	-	1
L997	-	<i>stx2c</i>	1



Tabella 2i. Caratterizzazione del ceppo test 5 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 5	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>stx2</i>	O187:H28	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	<i>stx2</i>	O187:H28	0
L010	<i>eae; stx2</i>	Non eseguito	2
L011	<i>stx2</i>	Non eseguito	0
L012	-	O124:H30	2
L013	<i>stx2</i>	O187:H28	0
L422	<i>stx2</i>	ONT	0
L501	<i>stx2</i>	ONT	0
L831	<i>stx2</i>	O187:H28	0
L909	<i>stx2</i>	O187:H28	0
L989	<i>stx2</i>	Non determinato	0
L990	<i>stx2</i>	Non eseguito	0
L996	<i>stx2</i>	Non determinato	2
L997	<i>stx2</i>	Non eseguito	0

Tabella 2l. Caratterizzazione del ceppo test 5 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 5	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>stp (=sta1)</i>	<i>stx2g</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	<i>stx2g</i>	2
L010	-	-	3
L011	-	-	3
L012	<i>st</i>	-	1
L013	<i>st</i>	<i>stx2g</i>	0
L422	-	<i>stx2g</i>	2
L501	<i>st</i>	<i>stx2g</i>	0
L831	-	<i>stx2a;stx2b</i>	4
L909	-	<i>stx2g</i>	2
L989	-	<i>stx2g</i>	2
L990	-	-	3
L996	-	-	3
L997	<i>st</i>	<i>stx2g</i>	0

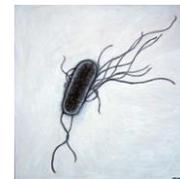


Tabella 2m. Caratterizzazione del ceppo test 6 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 6	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>stx1</i>	O104:H7	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	<i>stx1</i>	O104:H7	0
L010	<i>eae; stx1</i>	Non eseguito	4
L011	<i>stx1</i>	Non eseguito	2
L012	<i>stx1</i>	O111	2
L013	<i>stx1</i>	O104:H7	0
L422	<i>stx1</i>	O104	0
L501	<i>stx1</i>	O104	0
L831	<i>stx1</i>	O104:H7	0
L909	<i>stx1</i>	O104:H7	0
L989	<i>stx1</i>	O104	0
L990	<i>stx1</i>	Non eseguito	2
L996	<i>stx1</i>	wzx O104	0
L997	<i>stx1</i>	O104	0

Tabella 2n. Caratterizzazione del ceppo test 6 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 6	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>aaiC</i> *	<i>stx1c</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	<i>stx1c</i>	0
L010	-	-	1
L011	-	-	1
L012	-	-	1
L013	<i>aaiC;</i>	<i>stx1c</i>	0
L422	-	<i>stx1c</i>	0
L501	-	<i>stx1c</i>	0
L831	-	<i>stx1c</i>	0
L909	<i>aaiC;</i>	<i>stx1c</i>	0
L989	-	<i>stx1c</i>	0
L990	-	-	1
L996	-	-	1
L997	-	<i>stx1c</i>	0

* Non sono stati assegnati punti di penalità alla mancata rilevazione di *aaiC* (celle gialle) in quanto la variante allelica del gene *aaiC* presente in questo ceppo non viene rilevata dai metodi PCR incluso il metodo 05 dell'EUURL per *E. coli*.

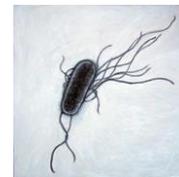


Tabella 2o. Caratterizzazione del ceppo test 7 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 7	Geni di virulenza <i>eae</i> ed <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	-	O124:H30	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	O124:H30	0
L010	<i>eae</i>	Non eseguito	2
L011	-	no	0
L012	-	no	0
L013	-	O124:H30	0
L422	-	ONT	0
L501	-	ONT	0
L831	-	Non determinato	0
L909	-	O124:H30	0
L989	-	Non determinato	0
L990	-	Non eseguito	0
L996	-	Non determinato	0
L997	-	Non determinato	0

Tabella 2p. Caratterizzazione del ceppo test 7 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Ceppo 7	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>ipaH</i>	-	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	-	2
L010	-	-	2
L011	-	-	2
L012	-	-	2
L013	<i>ipaH</i>	-	0
L422	<i>ipaH</i>	-	0
L501	<i>ipaH</i>	-	0
L831	-	-	2
L909	<i>ipaH</i>	-	0
L989	<i>ipaH</i>	-	0
L990	-	-	2
L996	<i>ipaH</i>	-	0
L997	<i>ipaH</i>	-	0

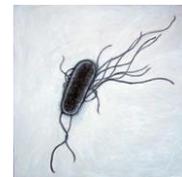


Tabella 2q. Caratterizzazione del ceppo test 8 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* ed *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 8	Geni di virulenza	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L010	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L011	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L012	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L013	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L422	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L501	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L831	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L909	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26:H11	0
L989	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L990	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	Non eseguito	2
L996	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0
L997	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O26	0

Tabella 2r. Caratterizzazione del ceppo test 8 – identificazione di geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

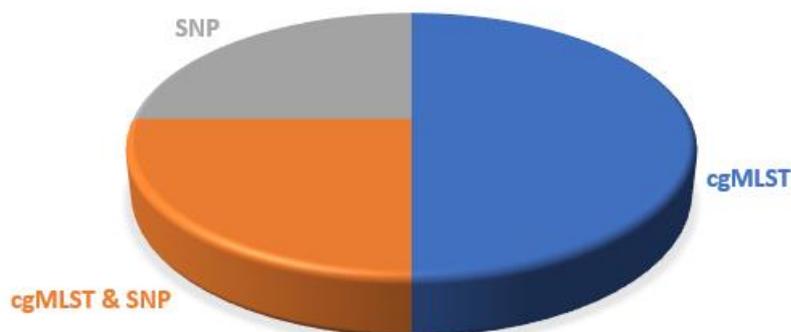
Ceppo 8	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	-	<i>stx2a</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L009	-	<i>stx2a</i>	0
L010	-	-	1
L011	-	-	1
L012	-	-	1
L013	-	<i>stx2a</i>	0
L422	-	<i>stx2a</i>	0
L501	-	<i>stx2a</i>	0
L831	-	<i>stx2b</i>	1
L909	-	<i>stx2a</i>	0
L989	-	<i>stx2a</i>	0
L990	-	-	1
L996	-	-	1
L997	-	<i>stx2a</i>	0



5.4 Analisi filogenetica

I risultati relativi alla Cluster analisi sono stati sottomessi da tutti i quattro laboratori che hanno effettuato analisi WGS (L009, L013, L831 e L909). L'analisi filogenetica è stata condotta in tre laboratori 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) e da un laboratorio unicamente con l'analisi SNP (figura 2).

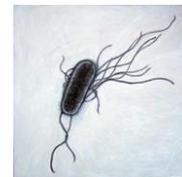
Figura 2. Strategie utilizzate dai laboratori partecipanti per l'analisi filogenetica



Nella tabella sottostante sono riportati i risultati ottenuti e l'interpretazione effettuata dai laboratori partecipanti. Tre dei quattro laboratori hanno individuato correttamente il cluster formato dai ceppi test 1, 2 e 8.

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;Yes	Distanza	Metodo
L009	Yes;Yes;No;No;No;No;No;Yes	7-8 allelic differences 0 SNPs	cgMLST; SNP
L013	Yes;Yes;No;No;No;No;No;No	19	SNP
L831	Yes;Yes;No;No;No;No;No;Yes	0-1	cgMLST
L909	Yes;Yes;No;No;No;No;No;Yes	0 allelic differences	cgMLST



6. VALUTAZIONE DELLA COMPETENZA DEI LABORATORI PARTECIPANTI

La competenza dei laboratori partecipanti è stata valutata in relazione alle diverse determinazioni, ed in particolare sono stati valutati separatamente:

1. Risultati riguardanti l'identificazione dei principali geni di virulenza di STEC, *eae* ed *stx*, e la determinazione del sierogruppo
2. Risultati della ricerca dei geni di virulenza di altri DEC e sottotipizzazione dei geni *stx*

Per quanto riguarda le prime determinazioni, solo due laboratori hanno mostrato una competenza non soddisfacente (figura 3a). I punti di penalità assegnati a questi due laboratori riguardavano per il laboratorio L010 principalmente l'identificazione di falsi positivi per il gene *eae*, mentre per L990 per la mancata identificazione di diversi sierogruppi. Questi laboratori saranno contattati e saranno proposte azioni correttive secondo la procedura sviluppata dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* e disponibile [qui](#).

Figura 3a. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante per l'identificazione dei geni *eae* ed *stx* e determinazione del sierogruppo

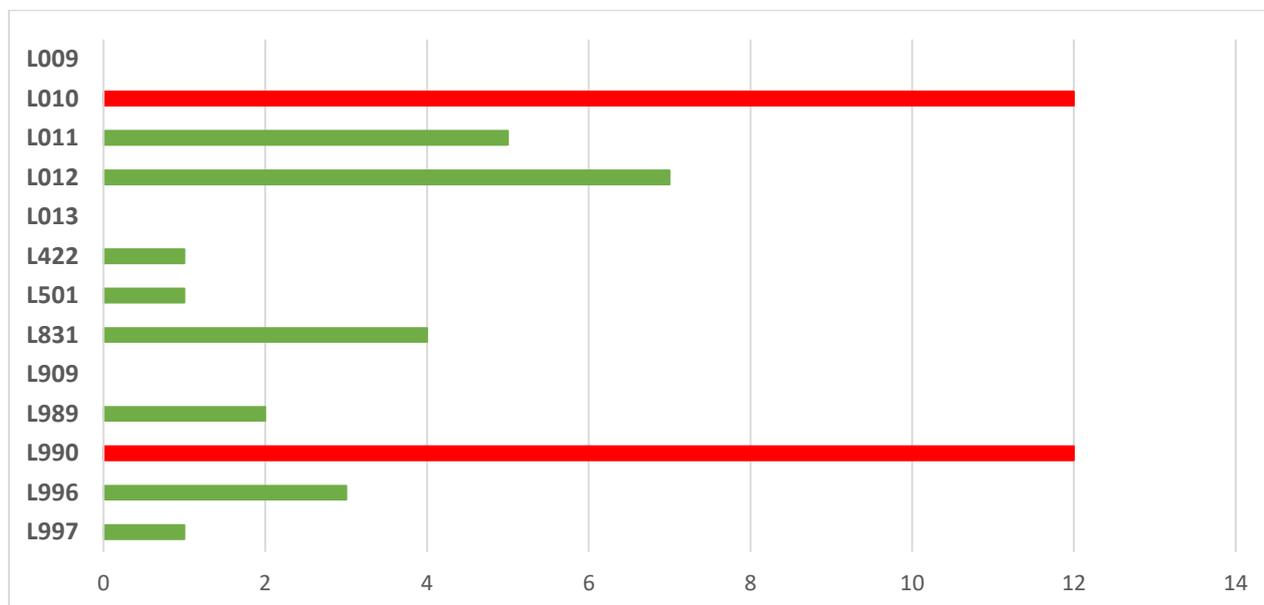
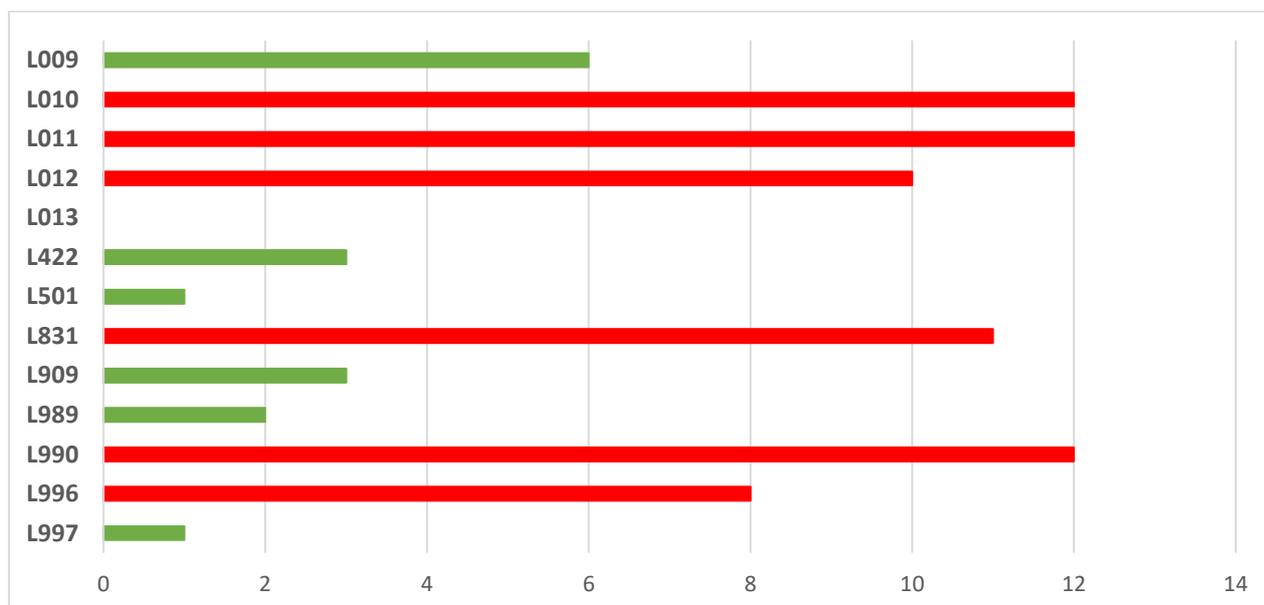




Figura 3b. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante per l'identificazione di geni di virulenza degli altri patotipi DEC oggetto dello studio e sottotipizzazione dei geni *stx*



Molti laboratori non hanno condotto i saggi di sottotipizzazione dei geni codificanti le Shiga tossine e la determinazione dei geni di virulenza associati agli altri patotipi DEC oggetto dello studio, tutte determinazioni indicate come obbligatorie, pertanto hanno raccolto numerose penalità, con 6 laboratori che hanno mostrato una performance non soddisfacente. Questi laboratori saranno contattati e saranno proposte azioni correttive secondo la procedura sviluppata dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* e disponibile [qui](#).

7. CONSIDERAZIONI FINALI

1. Tredici laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito allo studio. La partecipazione al circuito è stata considerata positivamente, mostrando un buon livello di interesse e collaborazione da parte del network
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. Diversi laboratori non hanno effettuato le determinazioni indicate come obbligatorie: questo identifica uno spazio di miglioramento e costituirà elemento di discussione *ad hoc* con questi laboratori.
4. L'identificazione dei sottotipi dei geni *stx* non è stata effettuata da tutti i laboratori: tuttavia questa caratterizzazione è utile per la valutazione del rischio, come indicato nell'ultima opinione pubblicata dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA BIOHAZ Panel, 2020), ed è auspicabile che venga applicata anche ai ceppi isolati da sorgenti alimentari e animali.
5. Tre dei quattro laboratori che hanno utilizzato metodi di tipizzazione basati sul WGS hanno dimostrato una ottima competenza sottolineando che questa metodologia può sostituire efficacemente tutte le determinazioni effettuate con metodiche classiche garantendo allo stesso tempo la possibilità di effettuare analisi di cluster. Un laboratorio ha mostrato delle difficoltà, in particolare nella determinazione del sottotipo dei geni *stx* e di geni di virulenza di DEC, identificando spazi di miglioramento nell'offerta formativa del LNR nell'ambito dell'analisi dei dati ottenuti per WGS.
6. L'adozione delle tecniche di tipizzazione molecolare genomica mediante WGS e l'analisi cluster deve essere estesa a più laboratori ufficiali.