



**Risultati del 5° studio inter-laboratorio (PT-PFGE5)
per la tipizzazione molecolare di ceppi di *Escherichia coli*
mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) – 2016**

Edited by: *Silvia Arancia, Paola Chiani, Clarissa Ferreri, Antonella Maugliani, Valeria Michelacci, Fabio Minelli, Stefano Morabito, Rosangela Tozzoli*

1. INTRODUZIONE

Nel 2012, la Commissione Europea (CE) ha deciso di organizzare la raccolta dei dati di tipizzazione molecolare di ceppi di *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e STEC isolati da alimenti e da animali, per integrare le attività di sorveglianza molecolare condotte dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sulle infezioni umane sostenute dalle stesse specie batteriche, nell'ambito del programma di sorveglianza "*Foodborne and waterborne diseases and zoonoses (FWD)*". La strategia di questo sistema di sorveglianza molecolare, volto ad aumentare il livello di preparazione nei confronti dei focolai epidemici di origine alimentare, è descritta nel documento della DG SANTE "*Vision paper on the development of data bases for molecular testing of foodborne pathogens in view of outbreak preparedness*", disponibile presso il sito web: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/vision-paper_en.pdf.

La raccolta dei dati molecolari avverrà nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi previste dalla Direttiva CE 99/2003. La relativa banca dati è gestita dalla *European Food Safety Authority* (EFSA), che si avvale del supporto tecnico e scientifico dei rispettivi Laboratori Europei di Riferimento (EURL). Secondo il mandato della DG SANTE, i dati di tipizzazione molecolare sugli isolati di origine alimentare e animale saranno principalmente prodotti dai Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) per i tre patogeni in questione, coadiuvati dalle rispettive reti nazionali di laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti.

Nel gennaio 2013 l'EFSA ha ricevuto dalla CE un mandato per fornire supporto tecnico per la raccolta di dati di tipizzazione molecolare e per lo sviluppo di una banca dati molecolari su isolati di *Salmonella*, *L. monocytogenes* e STEC da alimenti, mangimi, animali e l'ambiente correlato, in collaborazione con i pertinenti EURL. I dati saranno trasmessi all'EFSA dagli Stati membri, mentre gli EURL saranno curatori dei dati e contribuiranno all'analisi dei dati stessi. In questo contesto le procedure operative standard per la produzione, l'interpretazione e la "*curation*" dei profili PFGE sono state fornite dai tre EURL e pubblicate dall'EFSA (http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/704e.pdf;702e.pdf;703e.pdf).

Nel dicembre 2014, l'EFSA ha pubblicato le "*Technical specifications for the pilot on the collection of data on molecular testing of food-borne pathogens from food, feed and animal samples*" (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2014.EN-712/epdf>), dove sono stati forniti tutti i dettagli sui metadati, sull'analisi e sulla proprietà dei dati.

Per garantire la qualità dei dati molecolari riferiti ai ceppi VTEC che saranno raccolti nella banca dati dell'EFSA, l'EURL-VTEC ha istituito uno specifico programma di valutazione

esterna di qualità (VEQ) sulla tipizzazione mediante PFGE per i LNR. Un analogo programma viene condotto in parallelo in Italia dal LNR per l'*E. coli* a beneficio dei Laboratori Ufficiali. Questo documento rappresenta la relazione del quinto studio (PT-PFGE5) organizzato dal LNR per *E. coli* sulla tipizzazione PFGE per i Laboratori Ufficiali.

2. OBIETTIVI E DISEGNO DELLO STUDIO

Gli obiettivi principali dello studio erano:

- mettere la rete italiana dei Laboratori Ufficiali nelle condizioni di contribuire profili PFGE di elevata qualità alla banca dati EFSA sui ceppi STEC di origine alimentare e animale.
- effettuare un'ulteriore valutazione del livello di preparazione della rete dei Laboratori Ufficiali rispetto alla produzione di profili PFGE di qualità sufficiente a consentire l'inserimento nel database di profili molecolari che EFSA ha costituito.
- identificare gli aspetti del processo di produzione, raccolta e analisi dei dati molecolari che necessitano ancora di miglioramenti.

Inoltre, lo studio ha consentito un'ulteriore valutazione della capacità dei laboratori ufficiali di condurre un'analisi computerizzata dei profili di PFGE prodotti utilizzando il software *BioNumerics*.

Lo studio è stato condotto seguendo le prescrizioni dello standard internazionale ISO/IEC 17043:2010 "*Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*".

3. PARTECIPANTI

Hanno aderito allo studio sei Laboratori Ufficiali, afferenti a 6 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS):

- IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Laboratorio Regionale di Riferimento per Enterobatteri Patogeni, Teramo
- IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
- IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Riferimento Regionale Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
- IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
- IZS Umbria e Marche, Laboratorio Contaminanti Biologici, Perugia

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I campioni oggetto dello studio erano costituiti da 10 ceppi di *E. coli* (campioni da 1 a 10) seminati per infissione in agar molle. I campioni sono stati preparati il 19 e 20 Ottobre 2016 e conservati a temperatura ambiente fino al 2 Novembre, data in cui i campioni sono stati inviati ai laboratori partecipanti tramite corriere.

Per quanto riguarda la stabilità dei campioni, l'esperienza pregressa indicava che l'intervallo temporale tra la preparazione e la data fissata per la presentazione dei risultati da parte dei laboratori era tale da garantire la stabilità delle caratteristiche genetiche dei ceppi batterici oggetto di studio. L'omogeneità dei campioni è stata verificata secondo quanto prescritto dalla norma ISO 17043:2010, testando due serie di ceppi selezionati casualmente per la presenza di caratteristiche microbiologiche note.

I profili PFGE dei ceppi di test sono stati predeterminati presso il LNR per l'*E. coli* e sono stati considerati come *gold standard*, ovvero profili di riferimento utilizzati per valutare l'accettabilità di quelli presentati dai Laboratori Ufficiali (Figura 1).

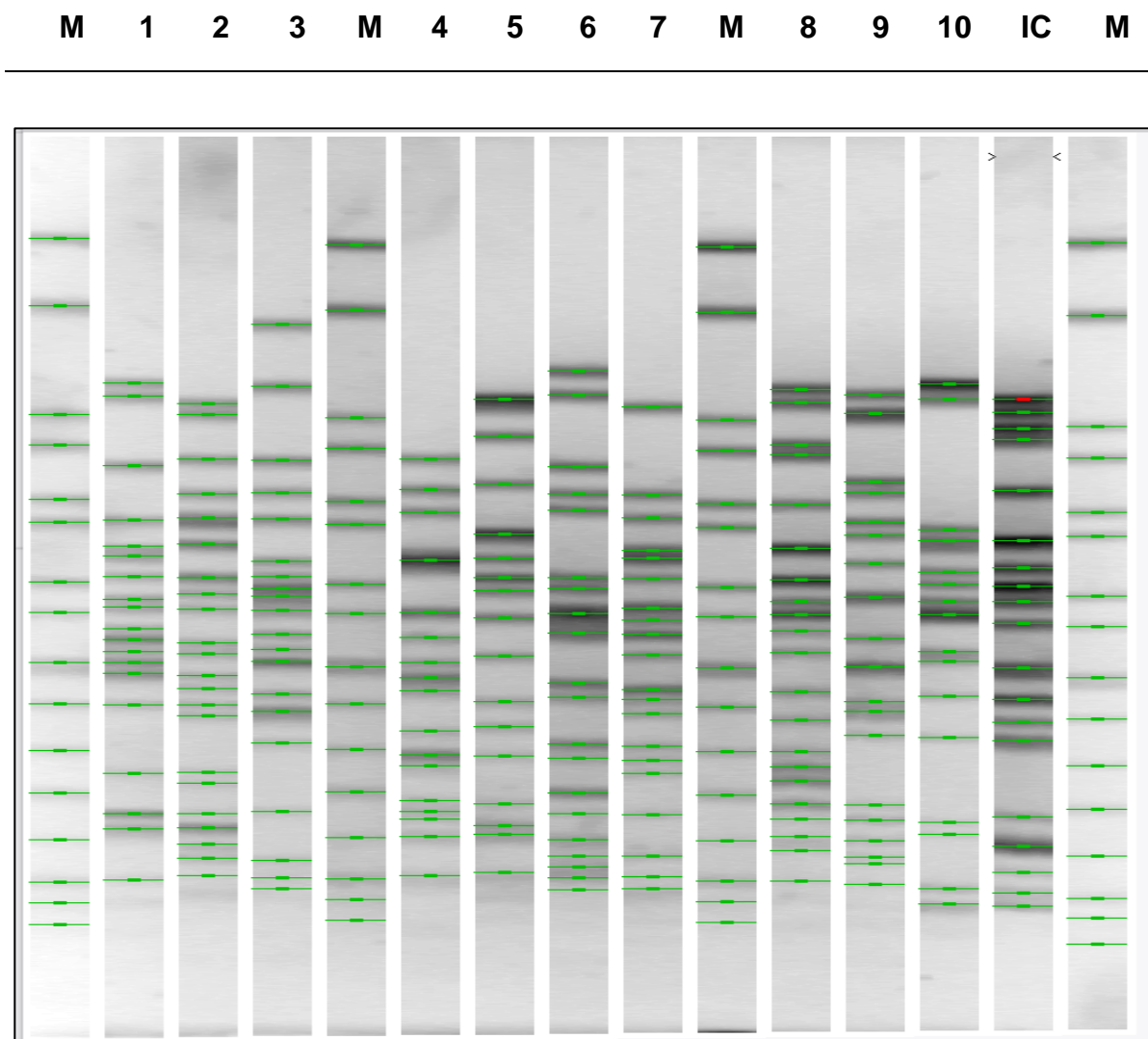


Figura 1. Profili di PFGE dei ceppi di *E. coli* inclusi nello studio. I pozzetti indicati con M contengono il DNA ottenuto dal ceppo *Salmonella enterica* sierotipo *Braenderup* H9812, che rappresenta il marcatore di peso molecolare.

4.2. Metodi di analisi

4.2.1. PFGE

Ai Laboratori è stato richiesto di utilizzare la procedura per la produzione di profili PFGE pubblicata dall'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>), che consiste in un adattamento della procedura PNL05 per *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri* in uso nel *PulseNet International Network* (PulseNet International, 2013). In particolare, è stato richiesto ai Laboratori di utilizzare le condizioni di corsa specifiche per *E. coli* O157:H7, prescindendo dal sierotipo dei ceppi test.

4.2.2. Analisi mediante *BioNumerics* software

Ai laboratori che si erano dichiarati disponibili a condurre l'analisi dei profili PFGE con il software *BioNumerics*, è stato richiesto di utilizzare la procedura per l'interpretazione e la "curation" dei profili pubblicata dall'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>).

4.3. Raccolta dei risultati

I laboratori hanno ricevuto una procedura dettagliata per l'invio dei risultati. In breve, i laboratori che non hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* hanno inviato le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, insieme allo schema di caricamento dei campioni ed a dettagli tecnici sul protocollo utilizzato, attraverso la *Restricted Area* della sezione *Proficiency Tests* del sito web dell'EURL-VTEC (www.iss.it/vtec), previa identificazione tramite *User ID* e *password*.

I Laboratori che hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* hanno inviato i profili PFGE dei ceppi analizzati, compresa la normalizzazione e l'assegnazione delle bande. I file inviati erano in formato XML, generati dal *BioNumerics* e comprendevano anche il caricamento dei campioni, le informazioni richieste e l'immagine del gel in formato TIFF.

4.4. Analisi dei risultati: valutazione visiva delle immagini dei gel

Le immagini dei gel sono state sottoposte a valutazione visiva, allo scopo di verificarne l'idoneità per la successiva analisi computerizzata. I criteri per la valutazione erano i seguenti:

- la posizione del gel nell'immagine: l'intero gel deve essere visibile, inclusi i pozzetti e le ultime bande, fino al margine inferiore del gel;
- la corretta identificazione dei campioni, mediante abbinamento con i codici assegnati ad ogni laboratorio;
- il corretto posizionamento dello standard *S. Braenderup H9812* nei pozzetti 1, 5, 10 (pettine da 10 pozzetti) o 1, 5, 10,15 (pettine da 15 pozzetti). La corretta posizione dello standard è importante per la corretta normalizzazione del gel, facilitando così il confronto dei profili PFGE da gel differenti;
- la messa a fuoco dell'immagine del gel, senza sovraesposizione delle bande;
- la posizione della banda a più basso peso molecolare dello standard, che deve trovarsi a 1 – 1,5 cm dal bordo inferiore del gel;
- l'intensità delle bande, che deve essere approssimativamente la stessa in ogni pozzetto;
- l'assenza di DNA non digerito;

- presenza di bande ben definite e distinte in ogni parte del gel; un certo grado di distorsione può essere accettato, ma non deve interferire con la successiva analisi computerizzata;
- lo sfondo del gel deve essere limpido;
- non deve essere presente degradazione del DNA;
- le condizioni della corsa elettroforetica;
- la risoluzione dell'immagine deve avere un valore di profondità pari a 8 bit.

4.5. Analisi computerizzata dei profili PFGE: analisi della distorsione della migrazione

Le immagini dei gel che hanno superato positivamente la valutazione visiva sono state sottoposte ad analisi computerizzata mediante il software *BioNumerics*, seguendo le procedure operative standard per l'interpretazione e la valutazione dei profili di PFGE pubblicate dall'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>). Il primo parametro considerato è stato la "distorsione della migrazione", che tiene conto appunto del grado di distorsione che i profili sottoposti ad analisi subiscono quando vengono comparati con quelli di riferimento, utilizzati come standard. Quando viene applicata l'opzione "*Distortion bar*" nella fase di normalizzazione del software *BioNumerics*, il livello di allungamento di ogni *lane* è visualizzato come una barra colorata, come mostrato in Figura 2. I colori chiari (azzurro o giallo) indicano un livello di distorsione accettabile (Figura 2, Pannello A). I colori più scuri (rosso o blu intenso) indicano una distorsione più marcata, che può tuttavia essere compensata dal software (Figura 2, Pannello B). Una colorazione nera indica distorsioni troppo marcate per essere compensate dal software (Figura 2, Pannello C). I profili sottoposti a questa analisi sono stati considerati idonei per la successiva *cluster* analisi quando, nella fase di normalizzazione, le barre di distorsione mostravano colori chiari (Figura 2, Pannelli A e B), mentre sono stati considerati non idonei quando mostravano colore nero (Figura 2, Pannello C). Per questi ultimi, pertanto, la *cluster* analisi non è stata eseguita.

Per i Laboratori che hanno inviato solo le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, questa analisi è stata effettuata dal LNR per l'*E. coli*.

Per i Laboratori che hanno effettuato l'analisi *BioNumerics*, il LNR per l'*E. coli* ha esaminato direttamente i file XML inviati. Quando sono stati riscontrati problemi (es. nella selezione dell'area dell'immagine, nell'assegnazione delle bande dello standard S. Braenderup H9812, nella sottrazione del background), l'analisi è stata ripetuta dal LNR.

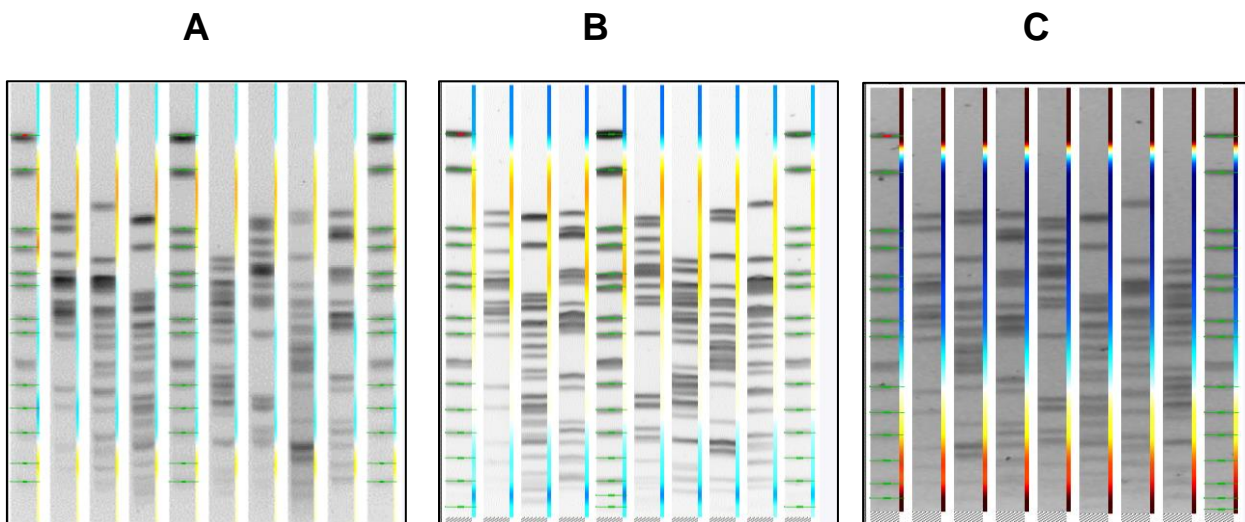


Figura 2. Esempi di analisi della “distorsione della migrazione”. Quadro A: colori chiari, indice di un basso livello di distorsione. Quadro B: colori più scuri, indice di un livello di distorsione più forte, ma ancora accettabile. Quadro C: colore nero, indice di un elevato e non accettabile livello di distorsione.

4.6. Analisi computerizzata dei profili PFGE: *cluster* analisi

Le immagini dei gel che sono state considerate accettabili dopo analisi della distorsione della migrazione sono state analizzate per l’assegnazione delle bande e la *cluster* analisi, utilizzando i profili PFGE prodotti dal LNR (Figura 1) come riferimento.

L’identità tra i profili in esame e quelli di riferimento è stata calcolata usando il coefficiente “Dice”, applicando parametri di ottimizzazione e tolleranza fissati al valore di 1,5 %. I profili sono stati considerati accettabili per l’inclusione nel database quando la *cluster* analisi riportava un valore di identità maggiore o uguale a 97 %. I profili che davano un valore inferiore a 97 % sono stati considerati “non accettabili”.

Per i laboratori che hanno inviato solo le immagini dei gel PFGE come file in formato TIFF, la normalizzazione, l’assegnazione delle bande e la *cluster* analisi sono state effettuate dall’LNR.

Per i laboratori che hanno effettuato l’analisi *BioNumerics*, l’assegnazione delle bande effettuata dal Laboratorio partecipante è stata utilizzata per la *cluster* analisi. Per i profili per cui la *cluster* analisi mostrava errori nell’assegnazione delle bande, l’assegnazione delle bande e la *cluster* analisi sono state ripetute dal LNR prima di valutare la prestazione del laboratorio.

4.7. Valutazione della prestazione dei laboratori

4.7.1. Valutazione dei profili PFGE

La capacità dei laboratori di produrre profili PFGE di qualità tale da consentirne l'inserimento in un database di profili molecolari è stata valutata come:

- **Eccellente:** quando tutti i profili presentati sono stati accettati.
- **Buona:** quando più del 70 % dei profili sono stati accettati.
- **Sufficiente:** quando tra il 30 % e il 60 % dei profili sono stati accettati.
- **Insufficiente:** quando più del 60 % dei profili non sono stati accettati.

4.7.2. Valutazione della capacità di condurre l'analisi BioNumerics

La capacità di condurre correttamente l'analisi *BioNumerics* è stata valutata per i Laboratori seguenti criteri:

- **A:** l'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio non richiedeva modifiche.
- **B:** l'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio richiedeva solo modifiche minori.
- **C:** l'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio richiedeva modifiche sostanziali o doveva essere completamente ripetuta.
- **D:** era necessario ripetere sia l'assegnazione delle bande che la normalizzazione.
- **E:** i file XML non erano utilizzabili per la *cluster* analisi.

4.7.3. Relazioni individuali

Ogni Laboratorio ha ricevuto una valutazione individuale della propria prestazione, un esame critico dell'immagine del gel e suggerimenti per migliorarne la qualità.

5. RISULTATI

Lo studio è stato condotto da sei Laboratori: 4 hanno inviato solo l'immagine del gel PFGE come file TIFF mentre 2 hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* ed inviato i files XML.

5.1. Valutazione dei profili PFGE

Tutte e sei le immagini di gel PFGE presentate sono state considerate analizzabili alla valutazione visiva (paragrafo 4.4). Alla successiva analisi computerizzata per la valutazione della distorsione della migrazione (paragrafo 4.5), quattro immagini sono risultate idonee per l'analisi. Un totale di 40 profili è stato quindi sottoposto alla *cluster* analisi per determinarne il livello di identità con i corrispondenti profili di riferimento (paragrafo 4.6). Nel complesso, 30 profili PFGE, su un totale di 40 (75 %), hanno mostrato un valore di identità

maggiore o uguale a 97% e sono stati quindi considerati accettabili per l'inclusione nel database di profili PFGE (Figura 3).

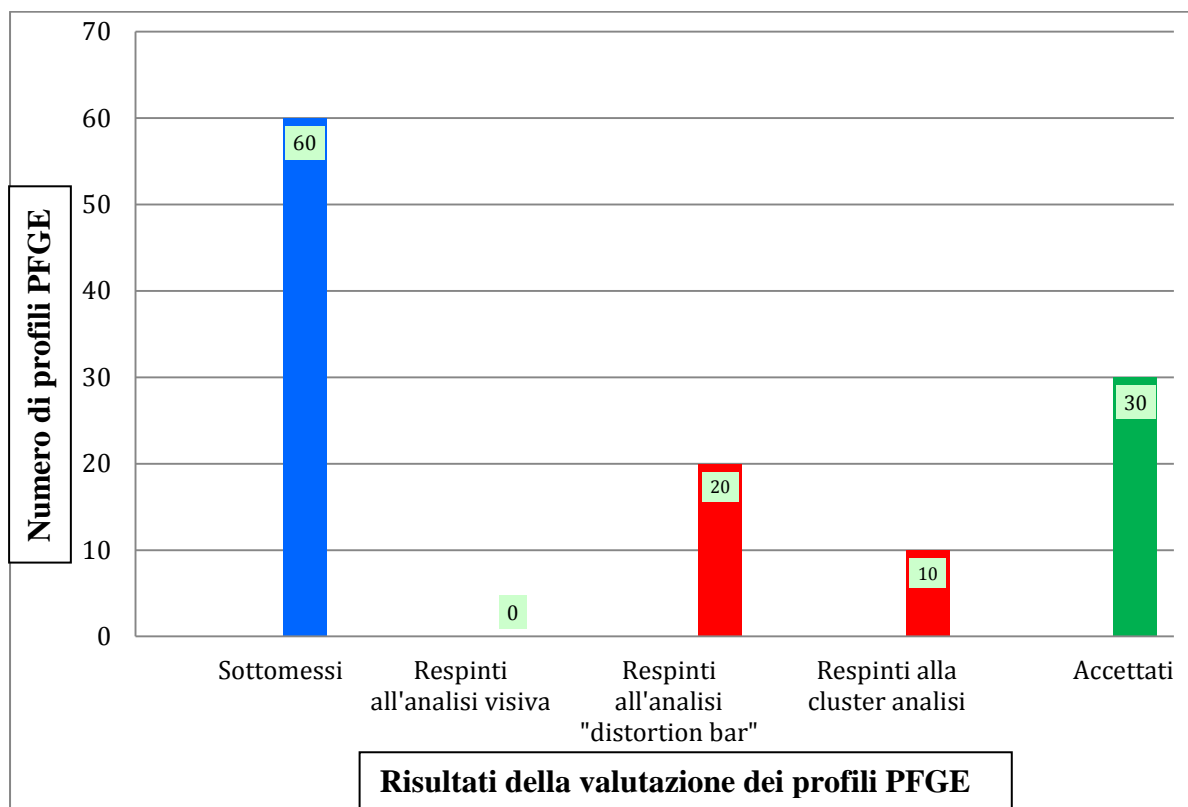


Figura 3. Valutazione dei profili PFGE ricevuti.

I valori di identità ottenuti attraverso la *cluster* analisi con i corrispondenti profili PFGE di riferimento sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Cluster analisi dei profili PFGE presentati dai Laboratori con i corrispondenti profili di riferimento. I profili sono stati considerati accettabili per valori di identità maggiori o uguali al 97 % rispetto a quelli di riferimento. Le celle colorate in verde indicano i profili ritenuti accettabili, quelle in rosso i profili ritenuti non accettabili. I numeri nelle celle indicano i valori di identità. NA: non analizzabile (la qualità del profilo è stata ritenuta non idonea per la cluster analisi).

Lab	Valore di similarità (%) dei profili PFGE presentati dai Laboratori con i corrispondenti profili di riferimento prodotti dall'LNR:									
	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10
L906	100	97,6	97,4	97,3	97,4	97	97,3	97,4	100	100
L341	100	97,6	100	100	100	97	97,3	100	100	100
L893	88,4	79,3	79,5	81,3	71,8	82,8	78,2	80	93,8	90,3
L881	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
L480	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
L203	100	100	97,6	97,4	97,4	100	97,3	97,4	97	100

Quattro Laboratori hanno presentato profili PFGE ritenuti accettabili e per tre di loro tutti i 10 profili inviati sono stati ritenuti accettabili.

La prestazione di ogni laboratorio è stata valutata utilizzando i criteri descritti nel paragrafo 4.7.1, sulla base del numero di profili PFGE ritenuti accettabili per l'inclusione in un database di profili molecolari. La valutazione ottenuta dai Laboratori è riportata in Figura 5.

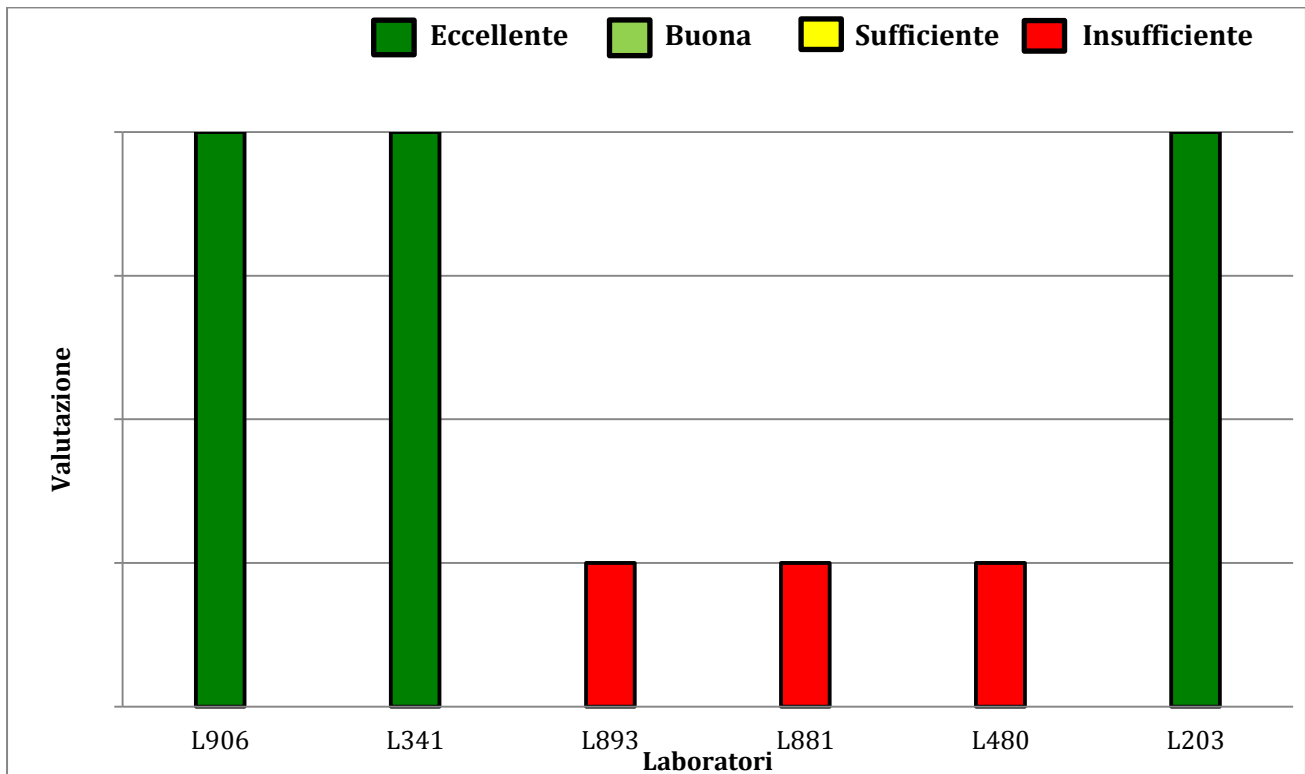


Figura 5. Valutazione della prestazione dei laboratori. Le barre rosse indicano i Laboratori la cui prestazione è stata considerata insufficiente.

Le problematiche tecniche riscontrate analizzando le immagini dei gel sono riportate in Figura 6, suddivise per tipologia. Per tre laboratori sono in particolare relative alla nitidezza delle bande, all'acquisizione dell'immagine ed alla colorazione del gel. Queste problematiche sono rilevanti, in quanto influiscono sulla possibilità di assegnare le bande del profilo PFGE

Ogni laboratorio ha ricevuto una relazione individuale, con commenti specifici e indicazioni per risolvere quanto riscontrato in fase di valutazione.

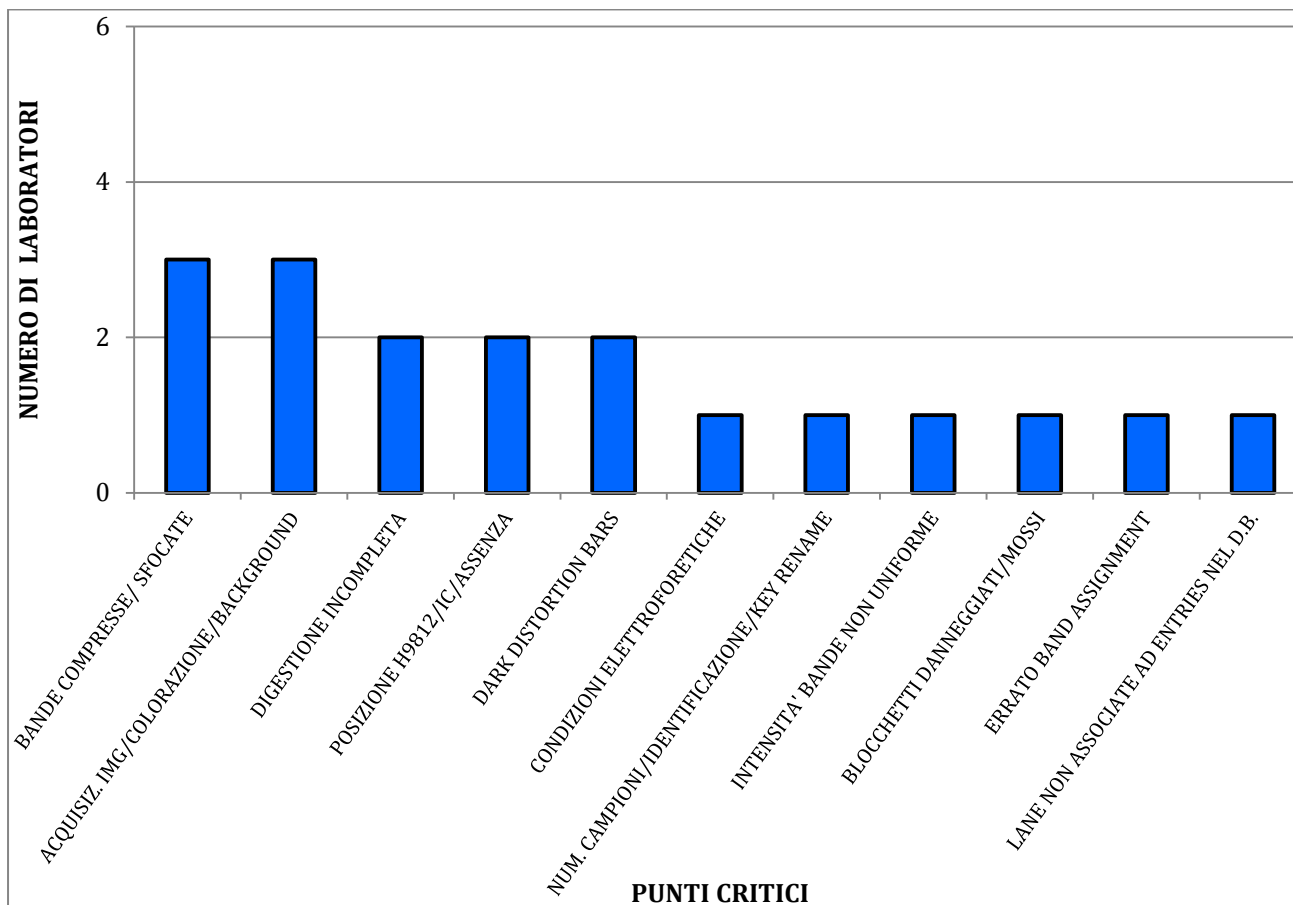


Figura 6. Problematiche tecniche più frequentemente riscontrate analizzando le immagini dei profili PFGE.

5.2. Valutazione della capacità dei laboratori di condurre l'analisi *BioNumerics*

La capacità dei laboratori di condurre l'analisi *BioNumerics* è stata valutata analizzando i file XML inviati e verificando che il laboratorio fosse in grado di importare correttamente i file per impostare il data-base in locale e analizzare i profili secondo le indicazioni inviate dall'LNR. I due laboratori che hanno condotto l'analisi sono stati quindi categorizzati secondo i criteri descritti nel paragrafo 4.7.2. Il laboratorio L906 rientrava nella categoria B, mentre il laboratorio L893 nella categoria E, in quanto il file XML presentato non è risultato utilizzabile per la *cluster* analisi.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio inter-laboratorio sulla tipizzazione molecolare mediante PFGE è parte del programma di VEQ, organizzato dalla rete dei Laboratori di Riferimento per l'*E. coli* (Reg. EC 882/2004), per preparare la raccolta dei dati di sorveglianza molecolare che si svolgerà nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zoonosi coordinate dall'EFSA.

A questo quinto studio hanno partecipato sei Laboratori, tutti hanno presentato immagini di gel PFGE ritenute accettabili per l'inserimento in un database di sorveglianza molecolare, sulla base delle procedure pubblicate da EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>).

Per tre di questi Laboratori, tutti i profili presentati sono stati ritenuti accettabili e la loro prestazione è stata valutata eccellente. Per quanto riguarda gli altri, la prestazione è stata valutata come insufficiente in quanto due hanno presentato profili non accettabili e l'ultimo con un livello di omologia insufficiente ($\geq 97\%$) ai corrispondenti profili di riferimento.

Lo studio ha inoltre consentito di effettuare un'ulteriore valutazione della capacità dei laboratori di analizzare i profili PFGE prodotti utilizzando il software *BioNumerics*. Dei due laboratori che l'hanno effettuata, soltanto uno ha però dimostrato una buona capacità di analisi.

In conclusione, questo studio ha confermato che la rete dei laboratori italiani coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti è in grado di eseguire la tipizzazione molecolare attraverso la PFGE. Sono stati inoltre individuati i punti critici da implementare per consentire l'inserimento di profili di qualità sufficiente nel database molecolare che l'EFSA sta approntando.