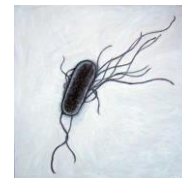




**Risultati del 38° test inter-laboratorio nazionale (PT38)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC) ed altri *E. coli*
diarreagenici – 2023**

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



1. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi del PT38, organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli*, erano valutare la competenza laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti nella:

1. Identificazione dei principali geni di virulenza STEC/EPEC (geni *eae* e *stx*).
2. Identificazione dei 14 sierogruppi STEC indicati nell'EURL-VTEC_Method_003.
3. Identificazione della presenza dei geni di virulenza che caratterizzano altri gruppi di *E. coli* patogeni (*ipaH* per EIEC, *sth* e *stp* e *lt* per ETEC, *aggR* e *aaiC* per EAEC).
4. Sottotipizzazione dei geni codificanti per le Shiga Tossine (Stx).
5. 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*.
2. L'identificazione di geni di virulenza associati ad altri patotipi di *E. coli* diarreagenici (DEC), ed in particolare i geni *ipaH* (EIEC), *sth*, *stp* e *lt* (ETEC), *aggR* e *aaiC* (EAEC).
3. La determinazione del sierogruppo dei ceppi test. Quest'ultimo modulo prevedeva l'identificazione dei seguenti 14 sierogruppi, selezionati in base alla loro importanza epidemiologica o normativa:

- ✓ O26, O103, O111, O145 e O157: i primi cinque sierogruppi STEC, coinvolti in gravi infezioni umane a livello mondiale.
- ✓ O45 e O121: sierogruppi epidemiologicamente rilevanti negli USA.
- ✓ O104: importante 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 era richiesto di identificare i sottotipi del gene *stx1* (*stx1a*, *stx1c* e *stx1d*) e del gene *stx2* (da *stx2a* a *stx2g*).

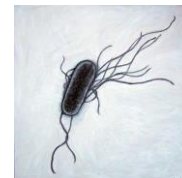
Le determinazioni analitiche potevano essere eseguite utilizzando qualunque metodica in uso nel laboratorio, incluse metodiche NGS, o i metodi indicati dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* e pubblicati sul sito web nella sezione “Laboratory Methods” (<https://www.iss.it/web/iss-en/vtec-laboratory-methods>).

Inoltre, lo studio prevedeva un esercizio, su base volontaria, di 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 10 laboratori, di cui 9 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) ed una Azienda per la tutela della salute (ATS), di seguito elencati:

- ATS Milano Città Metropolitana - Laboratorio di Prevenzione, Milano
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana - UOT Toscana Nord -Pisa
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Bologna
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, UOS Genetica, Genomica e Bioinformatica, Portici (NA)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - S.C. Biotechnologie Applicate e Produzioni, Torino
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano (BA)
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)



4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

Otto ceppi di *E. coli* sono stati selezionati tra quelli presenti nelle collezioni batteriche del LNR per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, coltivati in purezza e verificati per la presenza di tutte le caratteristiche 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 PT38	Sierotipo	MLST	Profilo dei geni di virulenza DEC	Sottotipo <i>stx1</i>	Sottotipo <i>stx2</i>	Cluster
Ceppo 1	O104:H4	ST678	<i>aggR aaiC</i>	-	-	No
Ceppo 2	O9:H30	ST540	<i>sta1 stx2</i>	-	<i>stx2e</i>	No
Ceppo 3	O157:H7	ST11	<i>eae stx1 stx2</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2c</i>	Sì
Ceppo 4	O157:H7	ST11	<i>eae stx1 stx2</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2c</i>	Sì
Ceppo 5	O157:H7	ST11	<i>eae stx1 stx2</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	No
Ceppo 6	O26:H11	ST29	<i>eae</i>	-	-	No
Ceppo 7	O45:H2	ST20	<i>eae stx2</i>	-	<i>stx2f</i>	No
Ceppo 8	O128:H2	ST811	<i>stx1 stx2</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	No

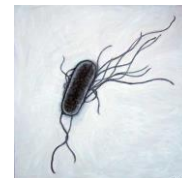


Tabella 1b: Geni di virulenza aggiuntivi identificati nei ceppi test tramite analisi WGS

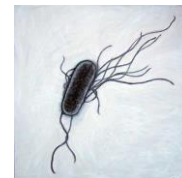
ID PT38	Virulotipo
Ceppo 1	<i>aap, aar, aata, afad, agga, aggb, aggc, aggd, capu, fyua, gad, iha, iucc, iuta, lpfa, mchb, mchc, mchf, neuc, orf3, orf4, pic, sepa, siga, terc, trat</i>
Ceppo 2	<i>gad, terc, trat</i>
Ceppo 3	<i>asta, chua, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, etpd, gad, iha, iss, katp, nlea, nleb, nlec, ompt, tccp, terc, tir, toxb, trat</i>
Ceppo 4	<i>asta, chua, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, etpd, gad, iha, iss, katp, nlea, nleb, nlec, ompt, tccp, terc, tir, toxb, trat</i>
Ceppo 5	<i>asta, chua, ehxa, espa, espb, espf, espj, espp, etpd, gad, iha, iss, katp, nlea, nleb, nlec, ompt, stx1a, stx1b, stx2a, stx2b, tccp, terc, tir, toxb, trat</i>
Ceppo 6	<i>asta, cia, cif, efa1, espa, espb, espf, espj, gad, iss, lpfa, mcma, nlea, nleb, nlec, ompt, papa, papc, terc, tir</i>
Ceppo 7	<i>asta, cba, cif, cma, espa, espb, espf, gad, hra, iss, nlea, nleb, nlec, ompt, tccp, terc, tir, trat</i>
Ceppo 8	<i>celb, cia, cvac, ehxa, espi, gad, iha, irea, iss, k88ab, kpse, kpsmii, lpfa, mchb, mchc, mchf, suba, terc, tia, trat</i>

I ceppi test sono stati preparati il 3 Ottobre 2023, 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 due mesi. Le colture sono state incubate per 18 ore a 37 °C ± 1 °C ed etichettate con codici numerici generati casualmente (di tre o quattro cifre), diversi per ciascuna serie di ceppi inviati ai laboratori partecipanti. Il controllo di omogeneità è stato eseguito il 9 Ottobre 2023 su sei set di ceppi test selezionati casualmente. I restanti campioni di prova sono stati conservati a temperatura ambiente fino al 23 Ottobre 2023, 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 SNP (Single Nucleotide



Polymorphism), wgMLST (whole genome Multilocus sequence Typing) o cgMLST (core genome Multilocus sequence Typing). In particolare, i laboratori dovevano indicare quali ceppi formavano un cluster e riportare l'intervallo di SNP o differenze alleliche osservato all'interno del cluster.

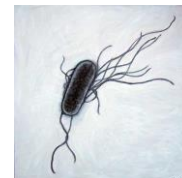
4.3. Invio dei risultati mediante formulario online

I risultati sono stati raccolti 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 partecipanti. La scadenza per riportare i risultati era il 20 Dicembre 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* e *stx2*.
- **2 punti** per ogni risultato errato o mancante riguardante l'identificazione dei geni *eae*, *ipaH*, *aggR*, *aaiC*, *lt*, *sth* e *stp*.
- **2 punti** per errori nella determinazione dei 14 sierogruppi indicati nel paragrafo 4.2. Inoltre non sono state assegnate penalità ai laboratori che non hanno identificato il sierogruppo O45 per il ceppo 7, in quanto non era identificabile con il metodo EURL-VTEC_Method_11.
- **1 punto** per ogni risultato riguardante l'identificazione dei sierogruppi, riportato come "Not Done" o "Null". Non sono state assegnate penalità a quei laboratori che hanno riportato ONT per la determinazione del sierogruppo del ceppo 2 in quanto il sierogruppo O9 cadeva al di fuori del campo di applicazione del metodo.
- **1 punto** per ogni risultato errato o mancante per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*. Non sono state assegnate penalità per la mancata identificazione del sottotipo *stx* per il ceppo 2, in quanto non tipizzabile con il metodo EURL-VTEC_Method_006. Infatti in questo ceppo è presente un elemento di inserzione *IS3* della famiglia delle *IS2* inserito



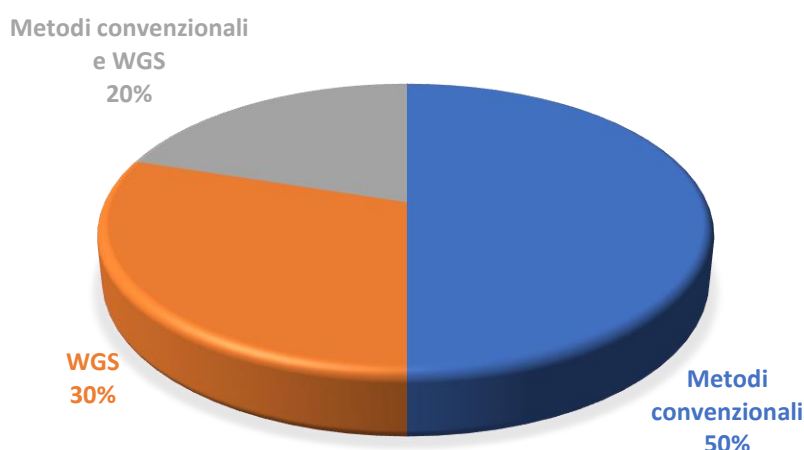
nella regione inter-genica delle subunità A e B del gene *stx2e*.

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 soddisfacente.

5. RISULTATI

Tutti i laboratori partecipanti hanno riportato i risultati. La Figura 1 mostra il numero di laboratori partecipanti in relazione ai metodi utilizzati per caratterizzare gli isolati.

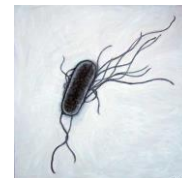
Figura 1. Laboratori partecipanti suddivisi per tipologia di metodo analitico



Tre laboratori hanno caratterizzato gli isolati mediante WGS (L013, L831, L909), cinque laboratori mediante metodi convenzionali (L024, L501, L989, L996, L997) e i restanti due laboratori mediante entrambi gli approcci (L422 e L702).

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 all'identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *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



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* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 1	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	-	O104:H4	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	O104:H4	0
L024	-	O104:H4	0
L422	-	O104:H4	0
L501	-	O104	0
L702	-	O104:H4	0
L831	-	O104:H4	0
L909	-	O104:H4	0
L989	-	O104	0
L996	-	O104	0
L997	-	O104:H4	0

Tabella 2b. Caratterizzazione del ceppo test 1 – identificazione dei 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>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>aaiC</i>	-	2
L024	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L422	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L501	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L702	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L831	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L909	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L989	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L996	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0
L997	<i>aggR</i> ; <i>aaiC</i>	-	0

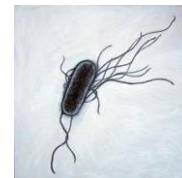


Tabella 2c. Caratterizzazione del ceppo test 2 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 2	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>stx2</i>	O9:H30*	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>stx2</i>	O9a:H30	0
L024	<i>stx2</i>	OND	0
L422	<i>stx2</i>	O9a:H30	0
L501	<i>stx2</i>	ONT	0
L702	<i>stx2</i>	O9a:H30	0
L831	<i>stx2</i>	O9:H30	0
L909	<i>stx2</i>	O9:H30	0
L989	<i>stx2</i>	ONT	0
L996	<i>stx2</i>	OND	0
L997	<i>stx2</i>	Not found	0

*: Non sono stati attribuiti punti di penalità in quanto il sierogruppo O9 cadeva al di fuori dai 14 sierogruppi la cui determinazione era obbligatoria

Tabella 2d. Caratterizzazione del ceppo test 2 – identificazione dei 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>stp (sta1)</i>	<i>stx2e</i> *	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>stp (sta1)</i>	<i>stx2e</i>	0
L024	-	-	2
L422	<i>stp (sta1)</i>	<i>stx2e</i>	0
L501	<i>stp (sta1)</i>	-	0
L702	<i>stp (sta1)</i>	<i>stx2e</i>	0
L831	-	<i>stx2e</i>	2
L909	<i>stp (sta1)</i>	<i>stx2e</i>	0
L989	<i>sth (sta2)</i>	-	2
L996	<i>lt; stp (sta1)</i>	-	2
L997	<i>sth (sta2); stp (sta1)</i>	-	2

*: Non sono stati attribuiti punti di penalità in quanto il sottotipo *stx* di questo ceppo non era tipizzabile con il metodo EURL-VTEC_Method_006 in quanto in questo ceppo è presente un elemento di inserzione di tipo *IS3* nel gene *stx2e*

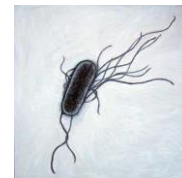


Tabella 2e. Caratterizzazione del ceppo test 3 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 3	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L024	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L422	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L501	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L702	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L831	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L909	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L989	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L996	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L997	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0

Tabella 2f. Caratterizzazione del ceppo test 3 – identificazione dei 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>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i> ; <i>stx2c</i>	1
L024	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L422	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L501	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L702	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L831	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L909	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L989	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L996	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2c</i>	0
L997	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2d</i>	1

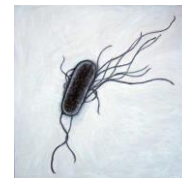


Tabella 2g. Caratterizzazione del ceppo test 4 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 4	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157:H7	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157:H7	0
L024	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157	0
L422	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157:H7	0
L501	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157	0
L702	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157:H7	0
L831	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157:H7	0
L909	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157:H7	0
L989	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157	0
L996	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157	0
L997	<i>eae; stx1; stx2</i>	O157	0

Tabella 2h. Caratterizzazione del ceppo test 4 – identificazione dei 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>stx1a; stx2c</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L024	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L422	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L501	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L702	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L831	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L909	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L989	-	<i>stx1a; stx2c; stx2d</i>	1
L996	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0
L997	-	<i>stx1a; stx2c</i>	0

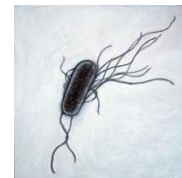


Tabella 2i. Caratterizzazione del ceppo test 5 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 5	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L024	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L422	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L501	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L702	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L831	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L909	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157:H7	0
L989	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0
L996	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	2
L997	<i>eae</i> ; <i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O157	0

Tabella 2l. Caratterizzazione del ceppo test 5 – identificazione dei 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>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L024	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L422	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L501	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L702	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L831	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L909	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L989	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0
L996	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i> ; <i>stx2c</i>	1
L997	-	<i>stx1a</i> ; <i>stx2a</i>	0

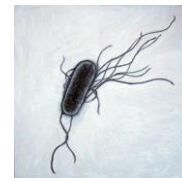


Tabella 2m. Caratterizzazione del ceppo test 6 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 6	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i>	O26:H11	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>eae; stx2</i>	O45:H2	6
L024	<i>eae</i>	O26	0
L422	<i>eae</i>	O26:H11	0
L501	<i>eae</i>	O26	0
L702	<i>eae</i>	O26:H11	0
L831	<i>eae</i>	O26:H11	0
L909	<i>eae</i>	O26:H11	0
L989	<i>eae</i>	O26	0
L996	<i>eae</i>	O26	0
L997	<i>eae</i>	O26	0

Tabella 2n. Caratterizzazione del ceppo test 6 – identificazione dei 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	-	-	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	<i>stx2f</i>	1
L024	-	-	0
L422	-	-	0
L501	-	-	0
L702	-	-	0
L831	-	-	0
L909	-	-	0
L989	-	-	0
L996	-	-	0
L997	-	-	0

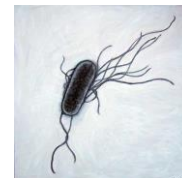


Tabella 2o. Caratterizzazione del ceppo test 7 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 7	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>eae</i> ; <i>stx2</i>	O45:H2*	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>stx1; stx2</i>	O128ac:H2	6
L024	<i>eae; stx2</i>	OND	0
L422	<i>eae; stx2</i>	O45:H2	0
L501	<i>eae</i>	ONT	4
L702	<i>eae</i>	O45:H2	4
L831	<i>eae; stx2</i>	O45:H2	0
L909	<i>eae; stx2</i>	O45:H2	0
L989	<i>eae</i>	ONT	4
L996	<i>eae; stx2</i>	OND	0
L997	<i>eae</i>	Not found	4

*: Non sono stati attribuiti punti di penalità in quanto il sierogruppo O45 non era identificabile con il metodo [EURL-VTEC Method 11](#).

Tabella 2p. Caratterizzazione del ceppo test 7 – identificazione dei 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>stx2f</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	<i>stx1c; stx2b</i>	2
L024	-	<i>stx2f</i>	0
L422	-	<i>stx2f</i>	0
L501	-	-	1
L702	-	<i>stx2f</i>	0
L831	-	<i>stx2f</i>	0
L909	-	<i>stx2f</i>	0
L989	-	-	1
L996	-	<i>stx2f</i>	0
L997	-	-	1

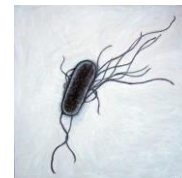
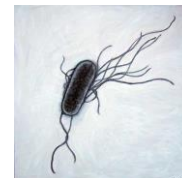


Tabella 2q. Caratterizzazione del ceppo test 8 – identificazione dei geni *eae*, *stx1* e *stx2* e determinazione del sierogruppo

Ceppo 8	Geni di virulenza <i>eae</i> e <i>stx</i>	Sierogruppo/sierotipo	Punti di penalità
Risultato atteso	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128:H2	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	<i>eae</i>	O26:H11	12
L024	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128	0
L422	<i>eae</i>; <i>stx1</i>; <i>stx2</i>	O128:H2	2
L501	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128	0
L702	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128ab:H2	0
L831	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128:H2	0
L909	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128:H2	0
L989	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128	0
L996	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128	0
L997	<i>stx1</i> ; <i>stx2</i>	O128	0

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

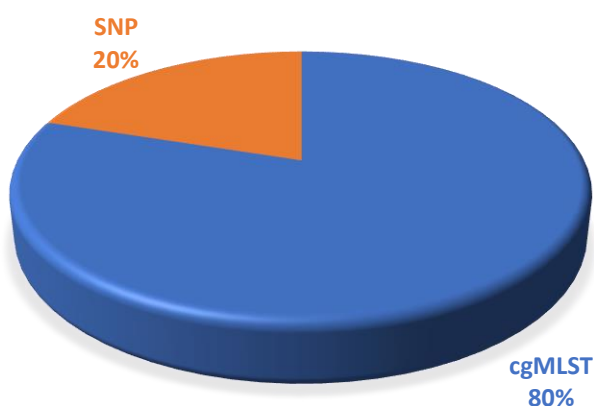
Ceppo 8	Geni di virulenza di DEC	sottotipizzazione <i>stx</i>	Punti di penalità
Risultato atteso	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	
Lcode	Risultato riportato	Risultato riportato	
L013	-	-	2
L024	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L422	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L501	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L702	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L831	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L909	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L989	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L996	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0
L997	-	<i>stx1c</i> ; <i>stx2b</i>	0



5.4 Analisi filogenetica

I risultati relativi alla Cluster analisi sono stati sottomessi da tutti i cinque laboratori che hanno effettuato analisi WGS. L'analisi filogenetica è stata condotta in quattro laboratori tramite analisi del genoma "core" (cgMLST) e in un caso mediante analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) (figura 2).

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



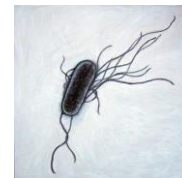
Nella tabella sottostante sono riportati i risultati ottenuti e l'interpretazione effettuata dai laboratori partecipanti. Tutti i laboratori hanno individuato correttamente il cluster formato dai ceppi test 3 e 4.

Tabella 3. Risultati dell'analisi filogenetica

Lcode	Risultato atteso (ceppi che formano un cluster-1;2;3;4;5;6;7;8): No;No;Yes;Yes;No;No;No;No	Distanza	Metodo
L013	No;No;Yes;Yes;No;No;No;No	2	cgMLST
L422	No;No;Yes;Yes;No;No;No;No	0	SNP
L702	No;No;Yes;Yes;No;No;No;No	1	cgMLST
L831	No;No;Yes;Yes;No;No;No;No	0	cgMLST
L909	No;No;Yes;Yes;No;No;No;No	0	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* e *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 (figura 3a), la maggior parte degli errori è stata rilevata nella caratterizzazione del ceppo test 7, per quanto riguarda l'identificazione dei geni *stx2*, appartenenti al sottotipo *stx2f*.

Nel complesso solo un laboratorio (L013) ha mostrato una competenza non soddisfacente (figura 3a). I punti di penalità assegnati a questo laboratorio riguardavano principalmente la caratterizzazione dei ceppi test 6, 7 e 8, per i quali è possibile che sia avvenuto uno scambio. Come indicato dalla procedura sviluppata dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* intitolata "Evaluation of the performance of the NRLs participating in the PTs organized by the EURL for *E. coli* and management of underperformance" (disponibile [qui](#)), il laboratorio L013 è stato già contattato per un follow up.

La maggior parte degli errori nella ricerca di geni di virulenza di altri DEC è stata riscontrata nella caratterizzazione del ceppo 2, che presentava un profilo ibrido di virulenza, con errori di identificazione o di caratterizzazione del gene *stp* (*sta1*), codificante la variante suina della tossina termolabile dei ceppi ETEC. Sono stati riscontrati numerosi errori anche nella sottotipizzazione dei geni *stx*. Nessun laboratorio ha superato la soglia di 8 punti per questa parte dello studio, dimostrando comunque una competenza soddisfacente da parte della rete di laboratori partecipanti.

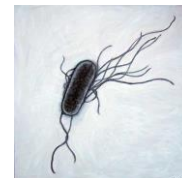


Figura 3a. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante per l'identificazione dei geni *eae* e *stx* e determinazione del sierogruppo

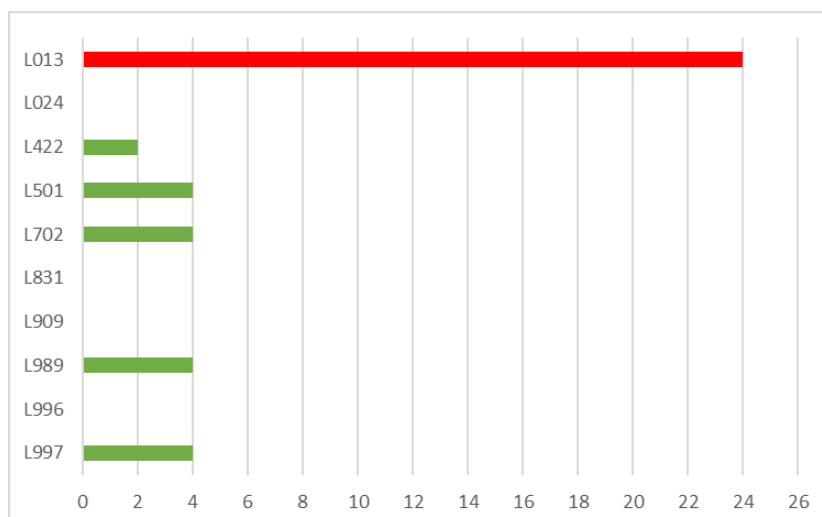
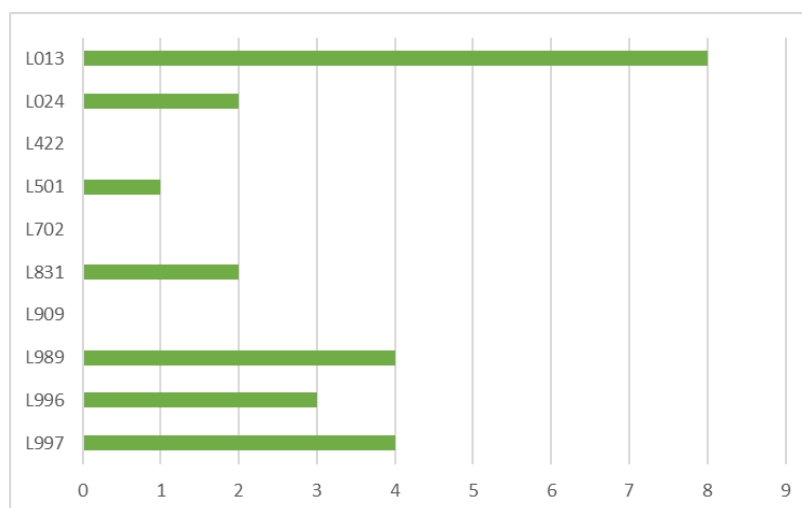
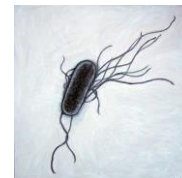


Figura 3b. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante per l'identificazione di geni di virulenza degli altri patotipi DEC oggetto dello studio e sottotipizzazione dei geni *stx*



7. CONSIDERAZIONI FINALI

1. Dieci 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. Quattro laboratori hanno registrato errori nell'identificazione dei geni *stx2* appartenenti al sottotipo *stx2f*, uno dei quali (L702) ha correttamente identificato il sottotipo pur non riportando la presenza dei geni *stx2* nella domanda relativa ai geni di virulenza, indicando un errore nel riportare i risultati. Nonostante questo sottotipo non sia rilevato dal metodo di Real Time PCR descritto nella metodica standard ISO/TS13136, è opportuno sottolinearne l'importanza, in quanto è stato identificato anche in ceppi isolati da pazienti affetti da Sindrome Emolitico Uremica. Metodiche di PCR in grado di rilevare la presenza di questo sottotipo sono descritte nei protocolli di laboratorio pubblicati presso la [pagina dedicata](#) del sito dell'EURL *E. coli* (Metodi 1, 6 e 10).
4. Rispetto ai precedenti circuiti interlaboratorio, si è registrato un incremento di laboratori che hanno eseguito la ricerca dei geni appartenenti a ceppi DEC diversi da STEC e la sottotipizzazione dei geni *stx*, sottolineando la rilevanza dell'organizzazione di questi studi per incoraggiare l'adozione di nuove metodiche nella rete di laboratori per determinazioni raccomandate dalle più recenti opinioni EFSA.
5. La maggior parte dei laboratori che hanno utilizzato metodi di tipizzazione basati sul WGS ha dimostrato un'ottima corrispondenza dei risultati riportati con gli attesi, sottolineando che questa metodologia può sostituire efficacemente le determinazioni effettuate con metodiche classiche. Inoltre, l'approccio di WGS ha permesso di effettuare analisi di cluster, eseguita correttamente da tutti i laboratori che vi hanno partecipato. Alcuni errori sono stati comunque riscontrati dai laboratori che hanno eseguito la caratterizzazione mediante il WGS, come la corretta identificazione del gene *stp* (*sta1*) nel ceppo 2 da parte del laboratorio L831 e dei geni *stx* nel ceppo 8 da parte di L422, identificando spazi di miglioramento nell'offerta formativa del LNR nell'ambito dell'analisi dei dati ottenuti per WGS.
6. Data l'efficacia delle tecniche di tipizzazione molecolare genomica basata sul WGS e l'analisi cluster, ne è auspicabile l'adozione da sempre più laboratori ufficiali.