

**Risultati del 41° test inter-laboratorio nazionale (PT41)
sull'identificazione e la tipizzazione di ceppi
di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossina (STEC) ed altri *E. coli*
diarreagenici – 2024**

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

1. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il PT41, organizzato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli*, aveva come obiettivo la valutazione della competenza dei laboratori ufficiali per quanto concerne:

1. l'identificazione della presenza dei geni di virulenza che caratterizzano i ceppi di *E. coli* patogeni (geni *eae* e *stx* per STEC/EPEC, *ipaH* per EIEC, *sth* e *stp* e *lt* per ETEC, *aggR* e *aaiC* per EAEC);
2. la determinazione dei 14 sierogruppi STEC indicati nell'EURL-VTEC Method 003 rev2;
3. la sottotipizzazione dei geni codificanti per le Shiga Tossine (Stx);
4. la caratterizzazione di un set di sequenze genomiche e l'identificazione di cluster sulla base dell'analisi genomica (esercizio volontario).

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 sei ceppi di *E. coli* patogeni e lo studio era articolato in quattro moduli analitici obbligatori per tutti i partecipanti:

1. identificare i principali geni di virulenza dei ceppi STEC, *stx1*, *stx2* e il gene *eae*;
2. individuare la presenza di geni di virulenza associati ad altri patotipi di *E. coli* diarreegenici, ed in particolare i geni *ipaH* (EIEC), *sth*, *stp* e *lt* (ETEC), *aggR* e *aaiC* (EAEC);
3. determinare il 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 infezioni umane gravi 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);

4. 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>).

In aggiunta, è stato condotto un esercizio volontario sull'analisi di dati di whole genome sequencing (WGS). I partecipanti hanno ricevuto un pannello di otto sequenze genomiche di ceppi patogeni di *E. coli* diversi da quelli inviati per l'esecuzione dei 4 moduli analitici. Ai partecipanti è stato richiesto di analizzarle e riportare risultati sulla qualità dei dati forniti, sulla loro caratterizzazione in termini di geni associati al sierotipo e geni di virulenza. Inoltre, i partecipanti dovevano indagare la correlazione tra i genomi basata sull'analisi delle sequenze fornite, in aggiunta alle sequenze dei sei ceppi test inviati per il PT41, se prodotte dai partecipanti. Ai laboratori che hanno partecipato a questo esercizio è stato chiesto di fornire la distanza tra i genomi identificati come parte di un cluster, in termini di intervallo di numero di SNP (*single nucleotide polymorphisms*) o di differenze alleliche rilevate mediante analisi cgMLST (*core genome Multi Locus Sequence Typing*).

3. PARTECIPANTI

In totale nove laboratori hanno aderito allo studio, di cui otto Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) e 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 dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sede Territoriale di Bologna
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano (BA)
- 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

I sei ceppi di *E. coli* patogeni sono stati selezionati tra quelli presenti nelle collezioni batteriche del LNR per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, coltivati in purezza e controllati per la presenza di tutte le caratteristiche richieste, riportate nella tabella 1a, prima dell'invio ai laboratori partecipanti.

La tabella 1b riporta i geni di virulenza accessori identificati tramite sequenziamento dell'intero genoma (WGS) presso il LNR per *E. coli*.

Il 26 Settembre 2024 i sei ceppi test sono stati preparati, partendo da colture stock mantenute in vapori azoto liquido. I ceppi sono stati rivitalizzati e le loro caratteristiche di riferimento sono state verificate (tabella 1a), quindi seminati in agar molle (0.3% agar in terreno nutriente) in fiale di vetro borosilicato. Per quanto concerne la stabilità dei ceppi inoculati in agar molle, i dati disponibili presso il Laboratorio Nazionale ed Europeo di Riferimento per *E. coli* indicano che queste colture sono stabili per oltre due mesi. Le colture sono state incubate per 18 ore a 37 °C ed etichettate con codici numerici di tre cifre generati casualmente, diversi per ciascuna serie di ceppi inviati ai laboratori partecipanti. Il controllo dell'omogeneità è stato eseguito il 2 ottobre 2024 su sei set di ceppi test selezionati casualmente. I restanti campioni di prova sono stati conservati a temperatura ambiente fino al 14 ottobre 2024, quando sono stati spediti ai laboratori partecipanti tramite corriere.

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

| ID PT41 | Sierotipo | MLST | Profilo dei geni di virulenza DEC | Sottotipo <i>stx1</i> | Sottotipo <i>stx2</i> | Cluster |
|----------|-----------|-------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Strain 1 | O146:H21 | ST442 | <i>stx1</i> | <i>stx1c</i> | - | No |
| Strain 2 | O55:H9 | ST301 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2f</i> | No |
| Strain 3 | O145:H28 | ST137 | <i>eae stx1</i> | <i>stx1a</i> | - | No |
| Strain 4 | O26:H11 | ST29 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2a</i> | Yes |
| Strain 5 | O86:H2 | ST10 | <i>aggR aaiC</i> | - | - | No |
| Strain 6 | O124:H30 | ST6 | <i>ipaH</i> | - | - | No |

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

| ID PT41 | Virulotipo |
|----------------|--|
| Ceppo 1 | <i>celb, cia, ehxa, espi, gad, iha, irea, iss, iucc, iuta, kpse, lpfa, mchb, mchc, mchf, ompt, senb, suba, terc, tia, trat</i> |
| Ceppo 2 | <i>cba, cia, cma, cvac, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espp, gad, hlyf, hra, iha, iron, iss, mchb, mchc, mchf, nlea, nleb, nlec, ompt, sita, terc, tir, trat</i> |
| Ceppo 3 | <i>asta, cba, celb, chua, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, gad, iha, iucc, iuta, neuc, nlea, nleb, nlec, tccp, terc, tir, trat</i> |
| Ceppo 4 | <i>asta, cba, cif, cma, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, nlea, nleb, ompt, tccp, terc, tir, trat</i> |
| Ceppo 5 | <i>aaic, aap, aar, aata, afad, agg3b, agg3c, agg3d, agg5a, aggr, espi, gad, iha, iucc, iuta, kpse, kpsmii, orf3, orf4, pic, terc</i> |
| Ceppo 6 | <i>capu, fyua, gad, iha, ipad, ipah9, iucc, iuta, pic, senb, siga, sita, terc, trat, virf</i> |

Inoltre, come parte di un esercizio volontario, i laboratori partecipanti hanno ricevuto tramite e-mail le istruzioni per scaricare un set di otto sequenze genomiche di altrettanti ceppi di *E. coli*, mediante accesso a una cartella condivisa. Questa cartella conteneva dati grezzi di WGS in formato *fastq* e un file di testo che elencava il “checksum MD5” per i file forniti, per consentire la verifica del corretto trasferimento dei file. Le caratteristiche dei genomi forniti sono riportate nelle Tabelle 2a e 2b.

Tabella 2a: Caratteristiche dei genomi di *E. coli* distribuiti (esercizio volontario)

| ID PT41 | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Sierotipo | MLST | Profilo dei geni di virulenza DEC | Sottotipo <i>stx1</i> | Sottotipo <i>stx2</i> | Cluster |
|--------------------|---|-----------|-------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| SEQ_A | Sì | O80:H2 | ST301 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2d</i> | No |
| SEQ_B | Sì | O171:H2 | ST332 | <i>stx2</i> | - | <i>stx2b stx2c</i> | No |
| SEQ_C | Sì | O26:H11 | ST29 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2a</i> | Yes |
| SEQ_D | Sì | O26:H11 | ST29 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2a</i> | Yes |
| SEQ_E | Sì | O26:H11 | ST29 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2a</i> | Yes |
| SEQ_F | Sì | O26:H11 | ST29 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2a</i> | No |
| SEQ_G ¹ | No | O26:H11 | ST21 | <i>eae stx2</i> | - | <i>stx2a</i> | No |
| SEQ_H ² | No | O98:H21 | ST306 | <i>eae stx1</i> | <i>stx1a</i> | - | No |

¹ La sequenza non era accettabile per l'analisi perché la profondità di copertura era 14x. Per questo motivo, la caratterizzazione e l'analisi dei cluster per questo ceppo non erano richieste.

² La sequenza non era accettabile per l'analisi perché la sequenza genomica del ceppo di *E. coli* era contaminata da sequenze di *Enterobacter asburiae*. Per questo motivo, la caratterizzazione e l'analisi dei cluster per questo ceppo non erano richieste.

Tabella 2b: Geni di virulenza accessori identificati nei genomi di *E. coli* distribuiti (esercizio volontario)

| ID PT41 | Virulotipo |
|---------|---|
| SEQ_A | <i>afaa, afab, afac, afad, afae8, cea, cia, cvac, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, mchb, mchc, mchf, nlea, nleb, nlec, ompt, sita, terc, tir, trat</i> |
| SEQ_B | <i>asta, cia, espi, espj, espj, gad, hra, iha, iss, lpfa, neuc, ompt, terc, trat</i> |
| SEQ_C | <i>asta, cba, cif, cma, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, nlea, nleb, ompt, tccp, terc, tir, trat</i> |
| SEQ_D | <i>asta, cba, cif, cma, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, nlea, nleb, ompt, tccp, terc, tir, trat</i> |
| SEQ_E | <i>asta, cba, cif, cma, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, nlea, nleb, ompt, tccp, terc, tir, trat</i> |
| SEQ_F | <i>cba, cif, cma, eae, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, etpd, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, nlea, nleb, ompT, tccp, terc, tir, trat</i> |
| SEQ_G | <i>asta, cif, efa1, ehxa, espa, espb, espf, espj, espj, espj, fyua, gad, iha, iss, iucc, katp, lpfa, nlea, nleb, nlec, terc, tir, toxb, trat</i> |
| SEQ_H | <i>asta, ehxa, espa, espf, espi, espj, fyua, gad, iha, iss, iucc, iuta, lpfa, nlea, nleb, nlec, ompt, tccp, terc, tir, trat</i> |

4.2. Metodi di laboratorio

I partecipanti dovevano identificare nei ceppi batterici test i principali geni di virulenza e il sierogruppo utilizzando qualsiasi metodo applicato nei rispettivi laboratori, incluso il sequenziamento WGS. I metodi per tutti i saggi erano anche disponibili nel sito dell'EURL-VTEC.

Per quanto concerne l'esercizio volontario sull'analisi di dati WGS, i partecipanti potevano utilizzare qualunque strumento di analisi bioinformatica utilizzato comunemente, inclusi software commerciali, prodotti "in house" o webserver pubblici o sotto dominio privato.

Ai laboratori che hanno partecipato a questa parte dello studio è stato chiesto di fornire i dati sulla qualità delle sequenze fornite, sulla loro caratterizzazione in termini di geni di virulenza e sierogruppo e la distanza tra i genomi identificati come parte di un cluster, in termini di intervallo di numero di SNP o di differenze alleliche e potevano anche fornire un albero filogenetico, se lo desideravano.

4.3. Invio dei risultati mediante formulario online

I risultati sono stati raccolti utilizzando un sito *web* dedicato sviluppato dal LNR per *E. coli*. La scadenza per riportare i risultati era il 7 Gennaio 2025.

4.4 Valutazione della performance dei laboratori

La competenza dei laboratori è stata valutata assegnando punti di penalità per ogni determinazione errata nella caratterizzazione 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.
- **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 O86 nel ceppo 5 e del sierogruppo O124 nel ceppo 6, in quanto questi sierogruppi cadevano al di fuori del campo di applicazione del metodo EURL-VTEC Method 003 rev2.
- **1 punto** per ogni risultato errato o mancante per l'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*.

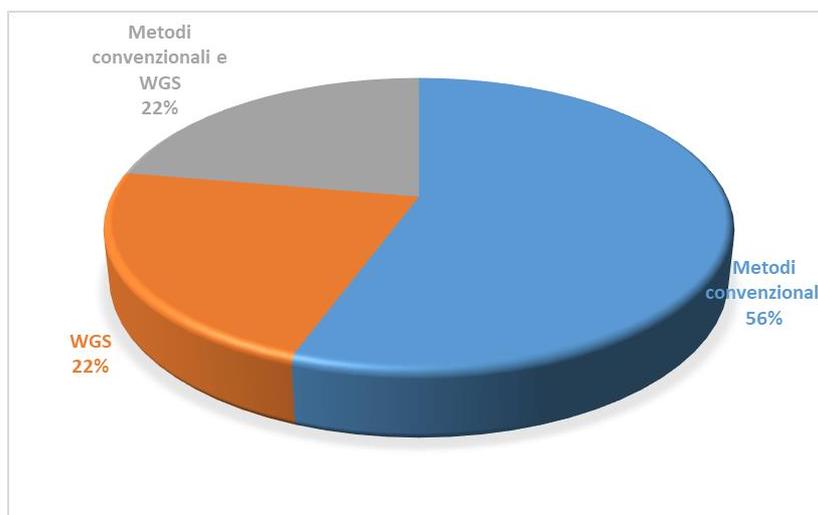
Nessun punto di penalità è stato assegnato ai risultati di caratterizzazione e analisi filogenetica non corretti per i campioni forniti come sequenze genomiche (esercizio volontario).

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 nove laboratori che hanno aderito al PT41 hanno riportato i risultati. La Figura 1 mostra la proporzione dei laboratori partecipanti in relazione ai metodi utilizzati per caratterizzare gli isolati.

Figura 1. Laboratori partecipanti suddivisi per tipologia di metodo analitico



5.1. Caratterizzazione dei ceppi test

I risultati relativi alla caratterizzazione dei ceppi riportati da ciascun laboratorio sono mostrati nelle tabelle seguenti (tabelle 3a - 3f). I risultati non corretti, che hanno portato all'assegnazione di punti di penalità, sono evidenziati in rosso.

Tabella 3a. Caratterizzazione del ceppo test 1

| Ceppo 1 | Geni di virulenza | Sierogruppo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> | Penalità | WGS |
|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------|-----|
| Risultato atteso | <i>stx1</i> | O146:H21 | <i>stx1c</i> | | |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | | |
| L008 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | |
| L024 | <i>stx1</i> | O146:H21 | <i>stx1c</i> | 0 | |
| L422 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | * |
| L501 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | |
| L702 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | * |
| L831 | <i>stx1</i> | O26 | <i>stx1c</i> | 2 | * |
| L909 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | * |
| L996 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | |
| L997 | <i>stx1</i> | O146 | <i>stx1c</i> | 0 | |

Tabella 3b. Caratterizzazione del ceppo test 2

| Ceppo 2 | Geni di virulenza | Sierogruppo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> | Penalità | WGS |
|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------|-----|
| Risultato atteso | <i>eae; stx2</i> | O55:H9 | <i>stx2f</i> | | |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | | |
| L008 | <i>eae</i> | O55 | <i>stx2f</i> | 4 | |
| L024 | <i>eae; stx2</i> | O55:H9 | <i>stx2f</i> | 0 | |
| L422 | <i>eae; stx2</i> | O55 | <i>stx2f</i> | 0 | * |
| L501 | <i>eae; stx2</i> | O55 | <i>stx2f</i> | 0 | |
| L702 | <i>eae; stx2</i> | O55 | <i>stx2f</i> | 0 | * |
| L831 | <i>eae; stx2</i> | - | <i>stx2f</i> | 1 | * |
| L909 | <i>eae</i> | O55 | - | 5 | * |
| L996 | <i>eae</i> | O55 | <i>stx2f</i> | 4 | |
| L997 | <i>eae; stx2</i> | O55 | <i>stx2f</i> | 0 | |

Tabella 3c. Caratterizzazione del ceppo test 3

| Ceppo 3 | Geni di virulenza | Sierogruppo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> | Penalità | WGS |
|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------|-----|
| Risultato atteso | <i>eae; stx1</i> | O145:H28 | <i>stx1a</i> | | |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | | |
| L008 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | |
| L024 | <i>eae; stx1</i> | O145:H28 | <i>stx1a</i> | 0 | |
| L422 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | * |
| L501 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | |
| L702 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | * |
| L831 | <i>eae</i> | - | - | 6 | * |
| L909 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | * |
| L996 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | |
| L997 | <i>eae; stx1</i> | O145 | <i>stx1a</i> | 0 | |

Tabella 3d. Caratterizzazione del ceppo test 4

| Ceppo 4 | Geni di virulenza | Sierogruppo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> | Penalità | WGS |
|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|----------|-----|
| Risultato atteso | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> | | |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | | |
| L008 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2d</i> | 1 | |
| L024 | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> | 0 | |
| L422 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> | 0 | * |
| L501 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> | 0 | |
| L702 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> | 0 | * |
| L831 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2c; stx2d</i> | 1 | * |
| L909 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2b</i> | 1 | * |
| L996 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> | 0 | |
| L997 | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> | 0 | |

Tabella 3e. Caratterizzazione del ceppo test 5

| Ceppo 5 | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> | Penalità | WGS |
|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------|-----|
| Risultato atteso | <i>aggR; aaiC</i> | O86:H2* | - | | |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | | |
| L008 | <i>aggR; aaiC</i> | - | - | 0 | |
| L024 | <i>aggR; aaiC</i> | - | - | 0 | |
| L422 | <i>aggR; aaiC</i> | - | - | 0 | * |
| L501 | <i>aggR; aaiC</i> | - | - | 0 | |
| L702 | <i>aggR; aaiC</i> | O86 | - | 0 | * |
| L831 | <i>aaiC</i> | - | - | 2 | * |
| L909 | <i>aggR</i> | O86 | - | 2 | * |
| L996 | <i>aggR; aaiC</i> | - | - | 0 | |
| L997 | <i>aggR; aaiC</i> | - | - | 0 | |

Tabella 3f. Caratterizzazione del ceppo test 6

| Ceppo 6 | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> | Penalità | WGS |
|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------|-----|
| Risultato atteso | <i>ipaH</i> | O124:H30* | - | | |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | | |
| L008 | <i>ipaH</i> | - | - | 0 | |
| L024 | <i>ipaH</i> | - | - | 0 | |
| L422 | <i>ipaH</i> | - | - | 0 | * |
| L501 | <i>ipaH</i> | - | - | 0 | |
| L702 | <i>ipaH</i> | O124 | - | 0 | * |
| L831 | <i>ipaH</i> | 124 | - | 0 | * |
| L909 | <i>ipaH</i> | O124 | - | 0 | * |
| L996 | <i>ipaH</i> | - | - | 0 | |
| L997 | <i>ipaH</i> | - | - | 0 | |

* Non sono stati attribuiti punti di penalità in quanto i sierogruppi O86 e O124 non sono inclusi tra i 14 sierogruppi la cui determinazione era obbligatoria, indicati nel metodo EURL-VTEC_Method_003_rev2.

5.2 Caratterizzazione dei genomi test

Tre laboratori hanno partecipato all'esercizio volontario di analisi WGS e i risultati riportati circa la caratterizzazione degli otto campioni aggiuntivi distribuiti come sequenze genomiche sono riportati nelle tabelle 4a - 4h. I risultati non corretti sono evidenziati in rosso.

Table 4a. Caratterizzazione del campione SEQ_A

| SEQ_A | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Risultato atteso | Sì | <i>eae; stx2</i> | O80:H2 | <i>stx2d</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O80 | <i>stx2d</i> |
| L702 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O80 | <i>stx2d</i> |
| L831 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O80 | <i>stx2a; stx2c; stx2d</i> |

Table 4b. Caratterizzazione del campione SEQ_B

| SEQ_B | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------|
| Risultato atteso | Sì | <i>stx2</i> | O171:H2 | <i>stx2b; stx2c</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>stx2</i> | O171 | <i>stx2b; stx2c</i> |
| L702 | Sì | <i>stx2</i> | O171 | <i>stx2c</i> |
| L831 | Sì | <i>stx2</i> | O171 | <i>stx2c</i> |

Table 4c. Caratterizzazione del campione SEQ_C

| SEQ_C | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Risultato atteso | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L702 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L831 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2c; stx2d</i> |

Table 4d. Caratterizzazione del campione SEQ_D

| SEQ_D | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Risultato atteso | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L702 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L831 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2c; stx2d</i> |

Table 4e. Caratterizzazione del campione SEQ_E

| SEQ_E | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Risultato atteso | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L702 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L831 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2c; stx2d</i> |

Table 4f. Caratterizzazione del campione SEQ_F

| SEQ_F | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Risultato atteso | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L702 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a</i> |
| L831 | Sì | <i>eae; stx2</i> | O26 | <i>stx2a; stx2c; stx2d</i> |

Table 4g. Caratterizzazione del campione SEQ_G

| SEQ_G | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogrupo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------|
| Risultato atteso | No ¹ | <i>eae; stx2</i> | O26:H11 | <i>stx2a</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Sì | <i>stx2</i> | - | <i>stx2a</i> |
| L702 | No | - | - | - |
| L831 | No | - | - | - |

¹ La sequenza non era accettabile per l'analisi perché la profondità di copertura era 14x. Per questo motivo, la caratterizzazione e l'analisi dei cluster per questo ceppo non erano richieste.

Table 4h. Caratterizzazione del campione SEQ_H

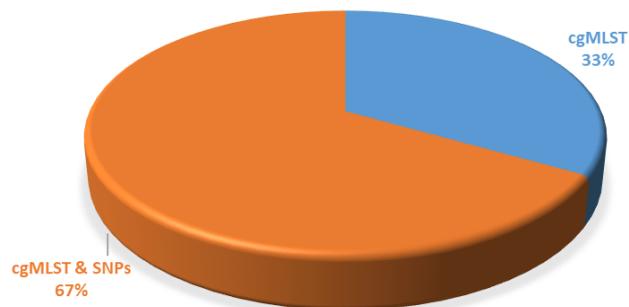
| SEQ_H | Accettabilità in base alla qualità della sequenza | Geni di virulenza | Sierogruppo/sierotipo | Sottotipo <i>stx</i> |
|------------------|---|---------------------|-----------------------|----------------------|
| Risultato atteso | No ¹ | <i>eae; stx1</i> | O98:H21 | <i>stx1a</i> |
| Labcode | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato | Risultato riportato |
| L422 | Si | <i>eae; stx1</i> | O98 | <i>stx1a</i> |
| L702 | No | - | - | - |
| L831 | No | - | - | - |

¹ La sequenza non era accettabile per l'analisi perché la sequenza genomica del ceppo di *E. coli* era contaminata da sequenze di *Enterobacter asburiae*. Per questo motivo, la caratterizzazione e l'analisi dei cluster per questo ceppo non erano richieste.

5.4 Analisi filogenetica

I risultati relativi alla analisi filogenetica sono stati inviati dai tre laboratori che hanno aderito all'esercizio volontario di analisi degli otto campioni distribuiti come sequenze genomiche. Due laboratori hanno condotto l'analisi sia mediante l'analisi SNP che l'analisi cgMLST, mentre un laboratorio ha utilizzato solo quest'ultima (figura 2). Il laboratorio L909 non ha partecipato all'esercizio volontario, pur avendo analizzato i ceppi ricevuti mediante WGS.

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



Nella tabella sottostante (tabella 5) sono riportati i risultati ottenuti e l'interpretazione effettuata dai laboratori partecipanti. Nessun laboratorio ha identificato correttamente l'intero cluster. Il laboratorio L422 non ha identificato il ceppo 4 come parte del cluster perché ha eseguito l'analisi filogenetica separatamente per i due gruppi di campioni, non confrontando le sequenze prodotte dal proprio laboratorio per i campioni inviati come ceppi con le sequenze fornite dall'LNR *E. coli*. Il laboratorio L831, che ha utilizzato il metodo cgMLST per l'analisi, ha riportato in nota di aver identificato due clusters diversi, uno comprendente il ceppo 4 e il campione SEQ_C e l'altro comprendente i campioni SEQ_D e SEQ_E.

Tabella 5. Risultati dell'analisi filogenetica

| | Strain 1 | Strain 2 | Strain 3 | Strain 4 | Strain 5 | Strain 6 | SEQ_A | SEQ_B | SEQ_C | SEQ_D | SEQ_E ¹ | SEQ_F | | |
|-------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|-------|-------|--------------------|-------|--------------------|---------------|
| Risultato atteso | No | No | No | Sì | No | No | No | No | Sì | Sì | Sì | No | | |
| Labcode | Risultati riportati | | | | | | | | | | | | Distanza | Metodo |
| L422² | No | No | No | No | No | No | No | No | Sì | Sì | Sì | No | 0-15 SNPs | cgMLST & SNPs |
| L702 | No | No | No | Sì | No | No | No | No | Sì | No | No | No | 0-5 AD e 0-15 SNPs | cgMLST & SNPs |
| L831³ | No | No | No | Sì | No | No | No | No | Sì | Sì | Sì | No | 0-4 AD | cgMLST |

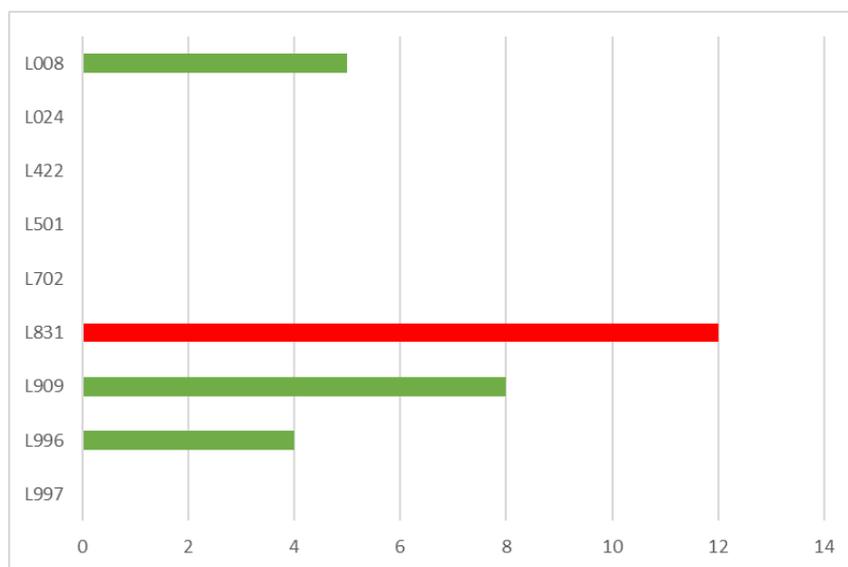
Caselle rosse: risultati errati; Caselle arancioni: il risultato di cluster si riferisce a due cluster differenti; AD: Differenze Alleliche;

¹SEQ_E era l'unica sequenza prodotta con sequenziamento "single-end" tra quelle distribuite; ² L422 ha eseguito l'analisi filogenetica separatamente per i due gruppi di campioni, non confrontando tra loro le sequenze prodotte dal proprio laboratorio per i campioni inviati come ceppi e le sequenze fornite dall'LNR per *E. coli*; ³ L831 ha riportato in nota di aver identificato due clusters diversi, uno comprendente il ceppo 4 e SEQ_C e l'altro comprendente SEQ_D e SEQ_E.

6. VALUTAZIONE DELLA COMPETENZA DEI LABORATORI PARTECIPANTI

La competenza dei laboratori partecipanti è stata valutata come descritto nel paragrafo 4.4. Un solo laboratorio (L831) ha mostrato una *performance* non soddisfacente.

Figura 3. Penalità assegnate a ciascun laboratorio partecipante



7. CONSIDERAZIONI FINALI

1. Nove laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito allo studio.
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. Tre laboratori hanno registrato errori nell'identificazione del gene *stx2* di sottotipo *stx2f*. Due di questi hanno correttamente identificato il sottotipo pur non riportando la presenza dei geni *stx2* nella domanda relativa ai geni di virulenza. 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. Tutti i laboratori sono stati in grado di identificare correttamente i geni di virulenza caratteristici degli *E. coli* enteroaggregativi (EAEC) (*aggR* e *aaiC*, ceppo 5) ed enteroinvasivi (*ipaH*, ceppo 6) presenti rispettivamente nei ceppi 5 e 6,

indipendentemente dal metodo utilizzato, con la sola eccezione di due laboratori che hanno identificato solamente uno dei due geni caratteristici degli EAEC.

5. Due dei tre laboratori partecipanti all'esercizio volontario di caratterizzazione delle sequenze genomiche (L702 e L831) hanno identificato correttamente come non accettabile la qualità delle sequenze SEQ_G e SEQ_H.
6. Due dei tre laboratori partecipanti (L422 e L702) hanno eseguito correttamente la caratterizzazione di tutte le sequenze fornite. Il terzo laboratorio (L831) ha riportato errori soprattutto nell'identificazione dei sottotipi dei geni *stx*.
7. Nessuno dei tre laboratori partecipanti all'esercizio volontario di analisi filogenetica ha identificato correttamente il cluster composto dai campioni: ceppo test 4, SEQ_C, SEQ_D e SEQ_E. In particolare, L422 ha riportato di aver analizzato separatamente i campioni forniti come ceppi e quelli forniti come sequenze genomiche, non identificando così il ceppo 4 come parte del cluster, ma dimostrando di avere la capacità di identificare il cluster di sequenze attraverso l'analisi delle sequenze fornite dal LNR per *E. coli*. Il laboratorio L702 non ha rilevato l'appartenenza al cluster di due delle sequenze genomiche (SEQ_D e SEQ_E), mentre L831 ha riportato i risultati corretti, ma ha specificato che i quattro campioni appartenevano a due cluster distinti, non identificando quindi la correlazione tra tutti i componenti attesi del cluster, forse a causa dell'uso di un valore soglia di differenze alleliche troppo basso per la definizione di un cluster. Per risolvere queste problematiche, verrà posta particolare attenzione sull'interpretazione dei dati di analisi filogenetiche nelle prossime edizioni dei corsi dedicati all'analisi di dati WGS organizzati dal LNR.