



Risultati del 1° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *E.coli* produttori di verocitotossina (VTEC) - 2007

Il 1° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *E.coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è stato organizzato nel 2007 dal Laboratorio Nazionale di Riferenza (LNR) per *E.coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità. Poiché il Laboratorio è anche Laboratorio Comunitario di Riferenza (CRL) per questo patogeno, il ring test nazionale è stato condotto contestualmente al ring test europeo. Quest'ultimo ha visto la partecipazione di 21 LNR di 17 Stati Membri dell'Unione Europea, attivi nel settore della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare.

1- PARTECIPANTI

Al ring test nazionale hanno partecipato i laboratori di 8 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sede di Torino
- IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, sede di Brescia
- IZS delle Venezie, sezione di Cordenons (Pn)
- IZS dell'Umbria e delle Marche, sede di Perugia
- IZS del Lazio e Toscana, sede di Roma
- IZS del Mezzogiorno, sezione di Salerno
- IZS della Puglia e Basilicata, sede di Foggia
- IZS della Sicilia, sede di Palermo

2- OBIETTIVI DEL TEST INTERLABORATORIO

Obiettivo del test interlaboratorio era di saggiare le capacità dei laboratori di identificare correttamente un ceppo di *E.coli* come VTEC, in particolare per i sierogruppi VTEC considerati più pericolosi per l'uomo. Questa verifica è da considerare propedeutica all'attivazione di attività di monitoraggio e controllo di questi agenti di zoonosi.

Il test consisteva di tre fasi:

1. L'identificazione dei ceppi come VTEC sulla base della dimostrazione:

- a. della loro capacità di produrre VT mediante saggi fenotipici (citotossicità su cellule Vero, kit immunologici)
 - b. e/o della presenza di geni VT-codificanti mediante PCR.
2. L'identificazione dei principali geni di virulenza dei VTEC:
 - a. il gene codificante per verocitotossina 1 (*vtx1*)
 - b. il gene codificante per verocitotossina 2 (*vtx2*)
 - c. il gene codificante per *eae* (intimina, fattore dell'adesione *attaching/effacing*).
 3. L'identificazione dei sierogruppi (antigeni O) maggiormente coinvolti nelle infezioni umane gravi.

3- MATERIALI E METODI

Il campione oggetto di analisi era costituito da 5 ceppi di *E.coli*. Per ciascuno di essi veniva richiesto di identificare il sierogruppo O, la produzione di VT libera, la presenza dei geni *vtx1*, *vtx2* ed *eae*.

A ciascun laboratorio è stato richiesto di eseguire le determinazioni analitiche con i metodi in uso presso il laboratorio stesso. Le caratteristiche dei ceppi sono riportate in tabella 1:

Tabella 1: caratteristiche dei ceppi di E.coli utilizzati nello studio

Ceppo	Sierogruppo	VT	vtx1	vtx2	eae
A07	O111	-	-	-	+
B07	O103	-	-	+	+
C07	O157	+	+	+	+
D07	O26	+	+	+	+
E07	O145	+	+	-	+

* Stipite in possesso di un gene modificato che può dare risultati PCR positivi o negativi in base alla coppia di primers utilizzati nella reazione.

Le performance analitiche di ciascun partecipante al test sono state valutate in termini di:

- Concordanza (Kappa di Cohen)
- Sensibilità
- Specificità

Per il calcolo di tali parametri sono stati confrontati i risultati delle determinazioni analitiche ottenute dai laboratori con i valori reali (gold standard) dei ceppi oggetto di analisi.

La stima del livello di concordanza ei risultati di ciascun laboratorio è stata ottenuta attraverso il calcolo del Kappa di Cohen. Si tratta di una misurazione dell'accordo sul risultato analitico ottenuto da diversi lettori (laboratori) sullo stesso campione analitico, indipendentemente dalla componente imputabile al caso. Per la valutazione dell'accettabilità del valore Kappa è stata utilizzata la griglia di giudizio proposta da *Fleiss J.L. (Statistical methods for rates and proportions, 1981)*. Pertanto valori di K superiori a 0,75 indicavano livelli di concordanza eccellenti, valori compresi tra 0,40 e 0,75 buona concordanza e valori inferiori a 0,45 livelli di concordanza scarsi.

La valutazione della sensibilità diagnostica è stata ottenuta in termini di rapporto tra il numero di campioni con esito positivo ovvero correttamente identificati dal laboratorio sul totale dei campioni realmente positivi (ovvero del determinato sierogruppo).

La valutazione della specificità diagnostica è stata ottenuta in termini di rapporto tra il numero di campioni con esito negativo, ovvero di sierogruppo diverso da quello in esame, secondo il laboratorio, sul totale dei campioni realmente negativi.

Per tutti i parametri è stato calcolato il relativo intervallo di confidenza (95% I.C.); il calcolo dell'I.C. della sensibilità e specificità diagnostica relative al sierogruppo è stato eseguito riponderando il numero delle determinazioni analitiche all'effettiva numerosità dei campioni analizzati.

4 - RISULTATI

Complessivamente sono state eseguite 153 determinazioni analitiche con una media, per ciascun laboratorio pari a 19,1. Due laboratori hanno eseguito tutte le 25 prove proposte, altri 2 laboratori hanno effettuato 20 prove mentre i restanti 4 laboratori un numero compreso tra 15 e 19.

Tutti i laboratori hanno eseguito i saggi per la caratterizzazione molecolare dei ceppi (identificazione dei geni *vtx1*, *vtx2*, *eae*), mentre l'identificazione del sierogruppo O e la dimostrazione della capacità di produrre VT ha coinvolto un numero inferiore di laboratori. I risultati delle determinazioni analitiche eseguite dai laboratori partecipanti e l'accordo con il valore di gold standard per ciascuna caratteristica sono riportate nella tabella 2.

Tabella 2. Risultati analitici dei laboratori partecipanti al ring test e loro concordanza con il valore gold standard

<i>test</i>	<i>ceppo</i>	<i>Gold Standard</i>	<i>laboratori</i>							
			<i>L22</i>	<i>L23</i>	<i>L24</i>	<i>L25</i>	<i>L26</i>	<i>L27</i>	<i>L28</i>	<i>L29</i>
Identificazione del sierogruppo VTEC	A07	O111	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	VERO	VERO	n.d.	VERO
	B07	O103	n.d.	n.d.	O157	VERO	VERO	VERO	n.d.	VERO
	C07	O157	n.d.	n.d.	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	D07	O26	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	VERO	VERO	n.d.	Altro
	E07	O145	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	VERO	VERO	n.d.	altro
Identificazione della produzione di VT	A07	-	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	n.d.	VERO	n.d.	n.d.
	B07	-	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	n.d.	VERO	n.d.	n.d.
	C07	+	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	n.d.	VERO	n.d.	n.d.
	D07	+	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	n.d.	VERO	n.d.	n.d.
	E07	+	n.d.	n.d.	n.d.	VERO	n.d.	VERO	n.d.	n.d.
identificazione del gene <i>vtx1</i>	A07	-	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	B07	-	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	C07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	D07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	E07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
identificazione del gene <i>vtx2</i>	A07	-	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	B07	*	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	C07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	D07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	E07	-	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
identificazione del gene <i>eae</i>	A07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	B07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	C07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	D07	+	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO	VERO
	E07	+	VERO	VERO	VERO	FALSO	VERO	VERO	VERO	VERO

4.1 Laboratori

Tutti i laboratori hanno riportato una concordanza eccellente, con valori di K superiori a 0,75. Cinque laboratori hanno avuto una concordanza perfetta. La concordanza complessiva (Figura 2) è risultata comunque eccellente (K=0.97; 95% C.I. 0.94 – 1.00).

La sensibilità diagnostica complessiva è stata del 97,5% (IC 95%: 93,3% – 99,8%). Cinque laboratori hanno riportato una sensibilità pari al 100%, due hanno riportato una sensibilità del 96% ed uno del 93%. (Figura 3).

La specificità complessiva è stata superiore rispetto alla sensibilità, con un valore pari al 99,1% (IC 95%: 90,5% - 100%) e comunque per tutti i laboratori valori superiori al 90%. Data la limitata numerosità dei campioni negativi inclusi nello studio, gli intervalli di confidenza per la specificità hanno un intervallo assai ampio (Figura 4).

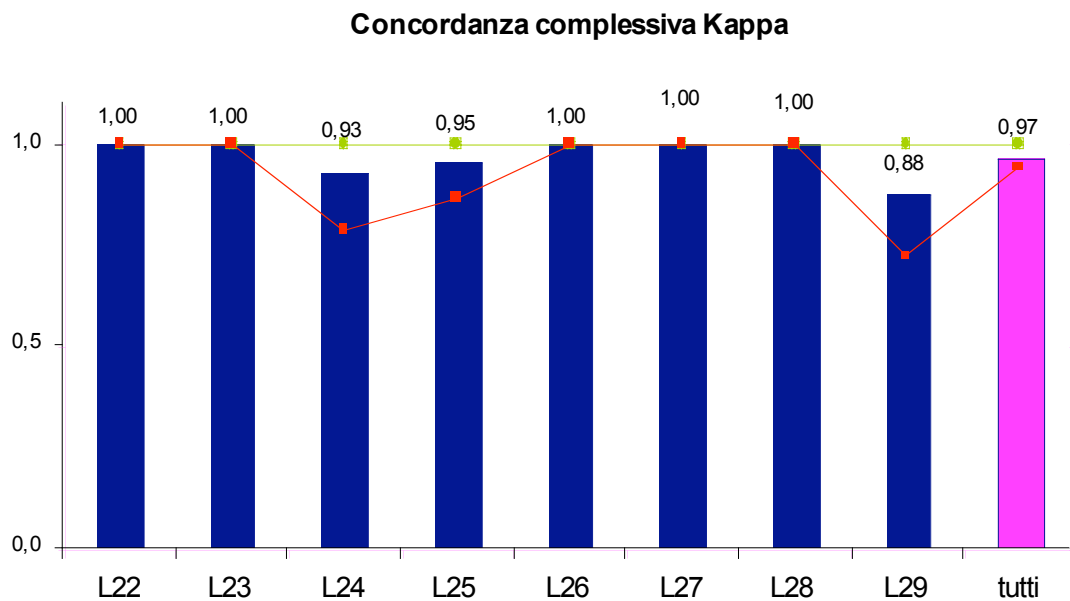


Figura 2. Valori di K per laboratorio e complessivo. Le linee verdi e rosse indicano i valori superiori ed inferiori dell'intervallo di confidenza al 95% del valore di K

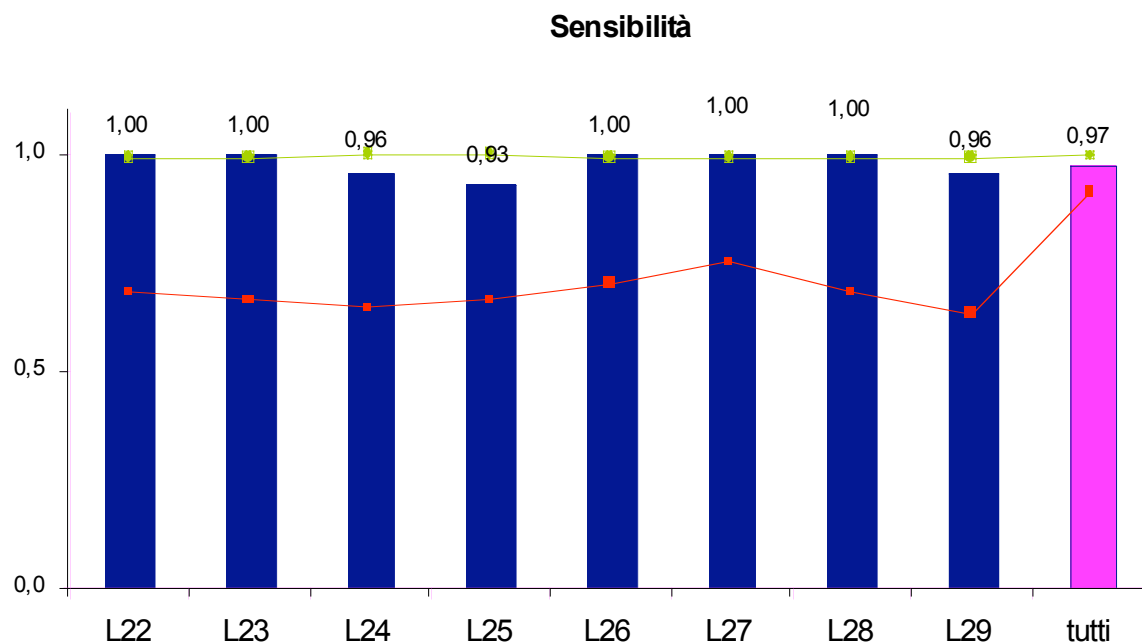


Figura 3 – Sensibilità diagnostica dei laboratori e relativi IC al 95%

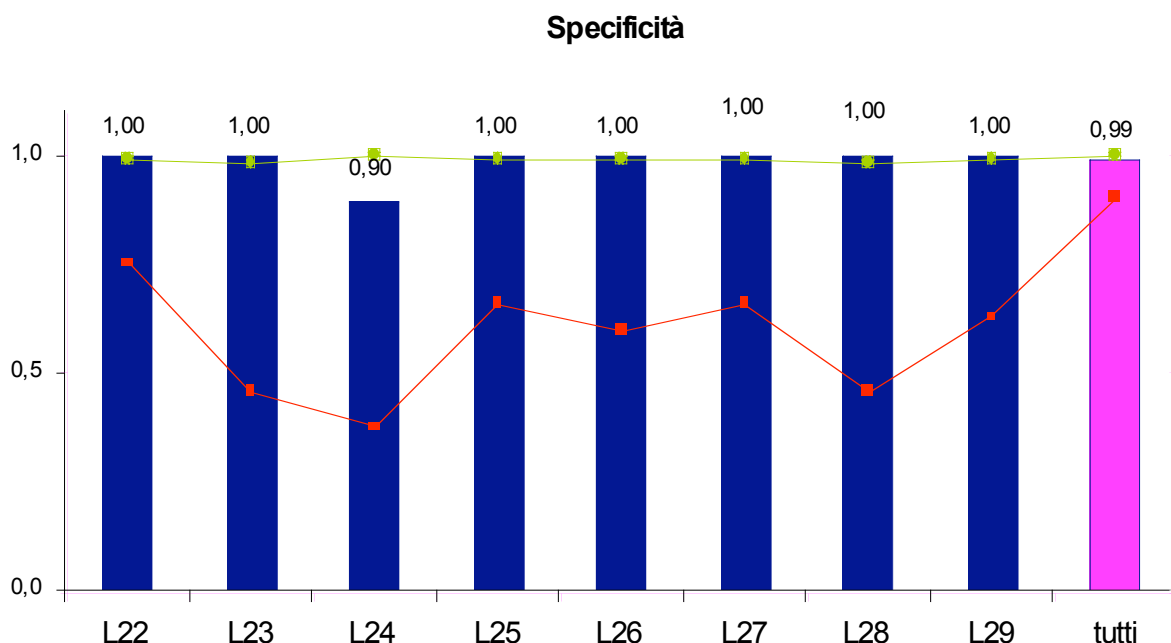


Figura 4 – Specificità diagnostica dei laboratori e relativi IC al 95%

4.2 Prove

4.2.1 Identificazione del sierogruppo

L'identificazione del sierogruppo VTEC è stata eseguita da 6 laboratori. Quattro di essi erano attrezzati per eseguire l'identificazione di tutti i sierogruppi VTEC proposti mentre per i restanti il saggio si limitava al sierogruppo O157.

Metodo utilizzato: agglutinazione su vetrino o in micropiastra.

Tutti i ceppi VTEC O157 e O111 sono stati correttamente identificati mentre sono stati commessi errori di identificazione dei ceppi O103, O145 e O26.

- Concordanza complessiva - K: 0,84 (CI 95%: 0,66 – 1)
- Sensibilità: 84,2% (49% – 100%)
- Specificità: 98,8% (94% – 100%)

4.2.2 Identificazione della produzione di VT

Il saggio diagnostico per la produzione di VT è stato eseguito da 2 laboratori, che hanno correttamente identificato le caratteristiche dei ceppi.

Metodo utilizzato: saggio su cellule Vero e test immuno-enzimatico EIA

- Concordanza complessiva - K: 1,00
- Sensibilità: 100% (52% – 98%)
- Specificità: 100% (40% – 98%)

4.2.3 Identificazione del gene *vtx1*

L'identificazione del gene *vtx1* è stata eseguita da tutti i laboratori partecipanti al test, che hanno correttamente identificato tutti i campioni.

Metodo utilizzato: PCR

- Concordanza complessiva - K: 1,00
- Sensibilità: 100% (76% – 99%)
- Specificità: 100% (83% – 100%)

4.2.4 Identificazione del gene *vtx2*

L'identificazione del gene *vtx2* è stata eseguita da tutti i laboratori partecipanti al test che hanno correttamente identificato tutti i campioni, compatibilmente con i primer utilizzati. Infatti, lo stipite B07 era atipico per la presenza di una sequenza di inserzione nel gene che codifica la subunità B della tossina VT2. Pertanto, l'utilizzo di oligonucleotidi disegnati sulla sequenza di questo gene poteva dare risultati negativi o prodotti di amplificazione di dimensione diversa da quella attesa. L'utilizzo di oligonucleotidi disegnati sul gene della subunità A, al contrario, dava una reazione positiva in ogni caso.

Metodo utilizzato: PCR

- Concordanza complessiva - K: 1,00
- Sensibilità: 100% (81% – 99%)
- Specificità: 100% (79% – 100%)

4.2.5 Identificazione del gene *eae*

L'identificazione del gene *eae* è stata eseguita da tutti i laboratori partecipanti al test che hanno correttamente identificato la presenza del gene in tutti i campioni ad eccezione di un laboratorio che ha riportato un falso negativo.

Metodo utilizzato: PCR

- Concordanza complessiva - K: non calcolabile
- Sensibilità: 97% (85% – 100%)
- Specificità: non calcolabile