

**Risultati del 6° studio inter-laboratorio (PT-PFGE6)
per la tipizzazione molecolare di ceppi di *Escherichia coli*
mediante *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) – 2017**

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

1. INTRODUZIONE

Questo documento rappresenta la relazione del sesto studio (PT-PFGE6) 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 otto Laboratori Ufficiali, afferenti a 7 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) ed una ARPA, dei quali solo 7 hanno sottomesso dei profili di PFGE. Ogni Laboratorio partecipante ha ricevuto un Laboratory code e un Report individuale.

1. Arpa Lazio, Roma
2. IZS Abruzzo e Molise "G. Caporale", Batteriologia e Igiene delle produzioni lattiero casearie, Teramo
3. IZS Puglia e Basilicata, UO Ricerca e Sviluppo Scientifico, Foggia
4. IZS Lombardia ed Emilia Romagna, Reparto Microbiologia, Brescia
5. IZS Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Roma
6. IZS Sardegna, Laboratorio di Microbiologia e Terreni Colturali, Sassari
7. IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Controllo Alimenti, Torino
8. IZS Umbria e Marche, Centro di Riferimento Patogeni Enterici CRRPE5, Perugia

4. MATERIALI E METODI

4.1. Preparazione dei campioni

I campioni oggetto dello studio erano costituiti da 6 ceppi di *E. coli* (campioni da 1 a 6) seminati per infissione in agar molle. I campioni sono stati preparati il 7 e 8 Novembre 2017 e conservati a temperatura ambiente fino al 13 Novembre, data nella quale 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 in maniera casuale, per la presenza di caratteristiche microbiologiche note.

I profili PFGE dei ceppi 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).

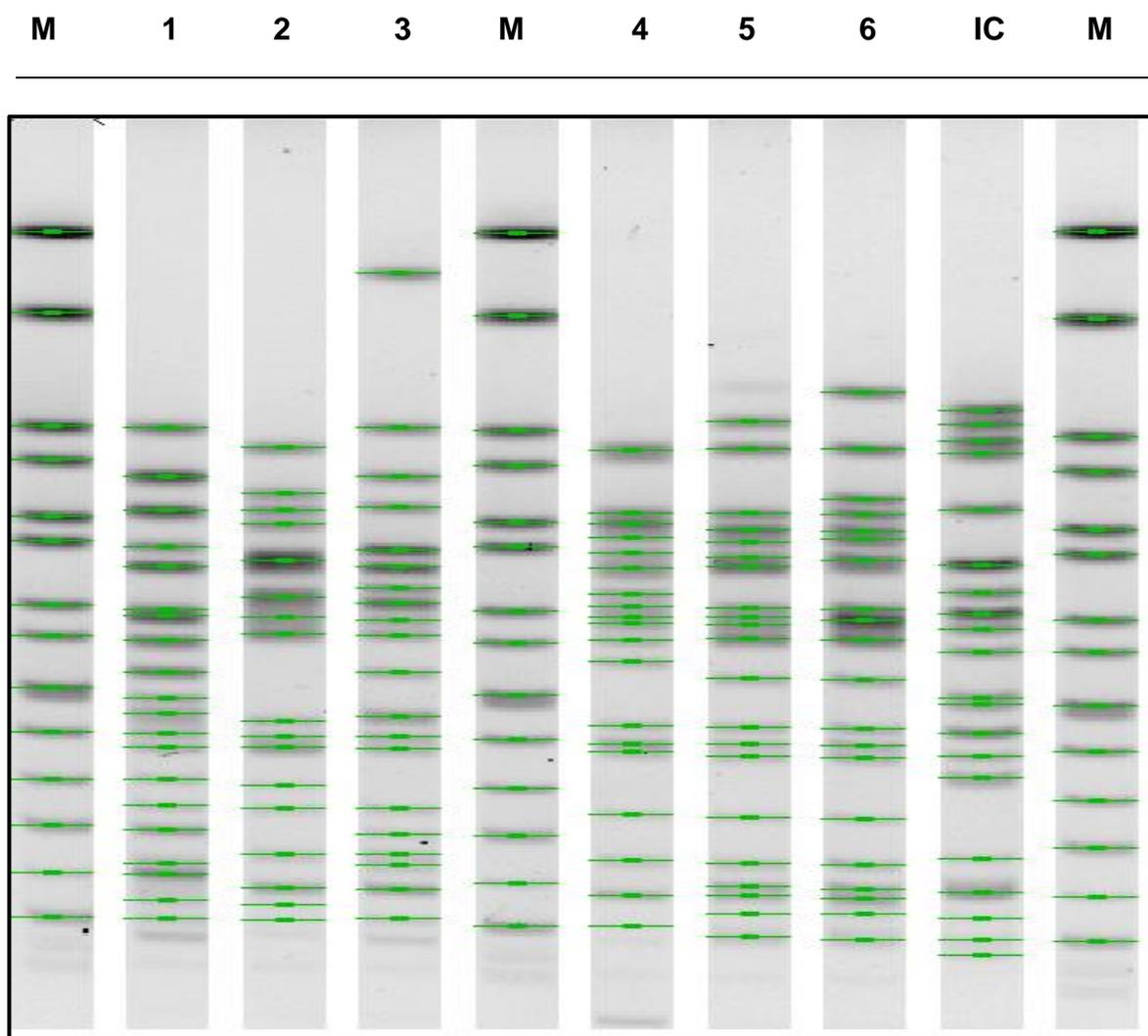


Figura 1. Profili di PFGE dei ceppi di *E. coli* inclusi nello studio. M: *Salmonella enterica* sierotipo *Braenderup* H9812, marcatore di peso molecolare.

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>).

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. Il tutto tramite la *Restricted Area* della sezione *Proficiency Tests* del sito web dell'EURL-VTEC (www.iss.it/vtec), e previa identificazione tramite *User ID* e *Password*.

I Laboratori che hanno effettuato l'analisi *BioNumerics* hanno invece inviato i profili PFGE dei ceppi analizzati, compresa la normalizzazione e l'assegnazione delle bande. I file inviati erano generati dal *BioNumerics* in formato XML 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 sono stati 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 tra 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 nella 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 ha esaminato direttamente i file XML inviati. Quando sono stati riscontrati problemi (per 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.

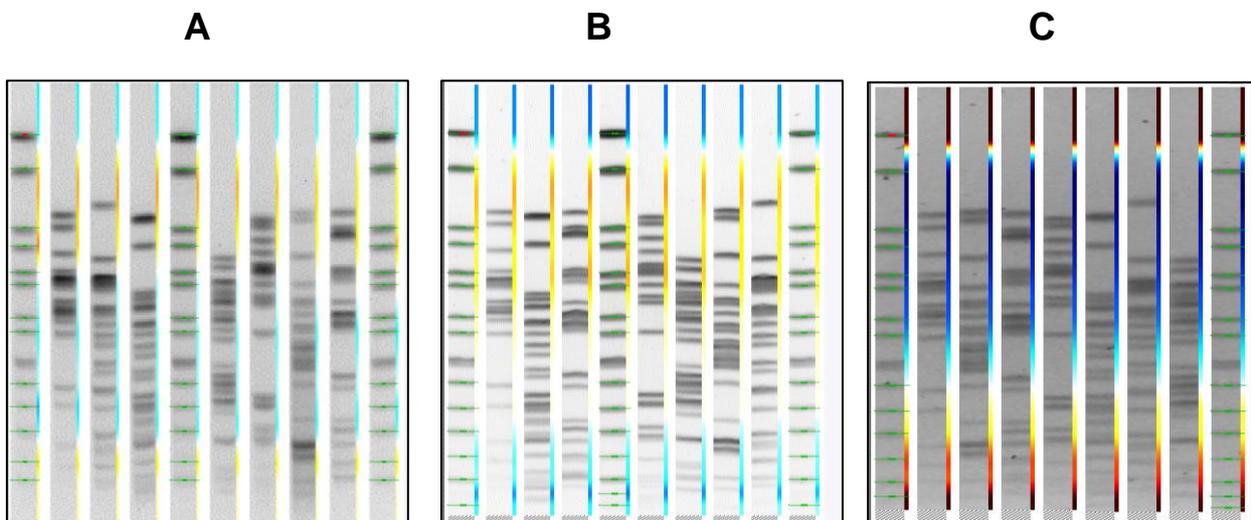


Figura 2. Esempi di analisi della “distorsione della migrazione”. Quadro A: colori chiari, indice di un basso livello di distorsione. Quadro B: colori più scuri, indice di un livello di distorsione più forte, ma ancora accettabile. Quadro C: colore nero, indice di un elevato e non accettabile livello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

Prima di valutare la prestazione del laboratorio però, nel caso in cui la *cluster* analisi mostrava errori nell’assegnazione delle bande, entrambi i passaggi sono stati ripetuti dal LNR.

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 su quanto sottomesso da sette Laboratori, che hanno inviato l'immagine del proprio gel PFGE come file TIFF o come file XML, ottenuto dopo aver analizzato il gel con il software *BioNumerics* (Figura 3).

5.1. Valutazione dei profili PFGE sottomessi

Le sette immagini di gel PFGE sono state inizialmente esaminate mediante valutazione visiva, come descritto nel paragrafo 4.4: tutti i 42 profili presentati hanno superato questa fase. Alla successiva analisi computerizzata per la valutazione della distorsione della migrazione (paragrafo 4.5), tre immagini (per un totale di 18 profili) hanno presentato distorsioni eccessive per essere compensate dal software e sono state considerate inaccettabili. I restanti 24 profili sono stati sottoposti alla *cluster* analisi per determinarne il

livello di identità con i corrispondenti profili di riferimento (paragrafo 4.6) e 22 di essi (52 %) sono stati considerati idonei (identità \geq 97 %) per l'inclusione nel database di profili PFGE (Figure 4 e 5).

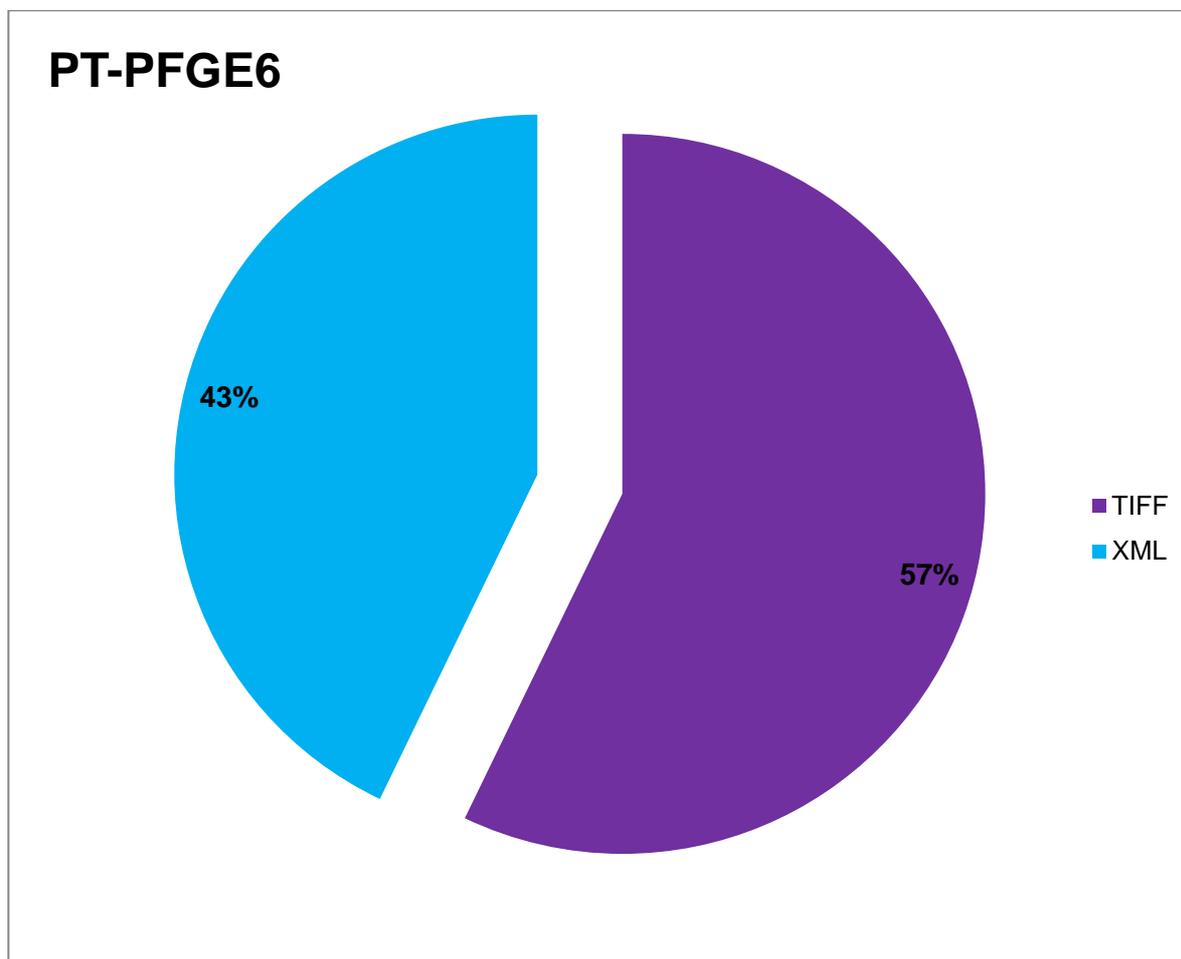


Figura 3: Percentuale dei laboratori che hanno sottomesso le immagini del gel, sia come file TIFF che come file XML (7 Laboratori).

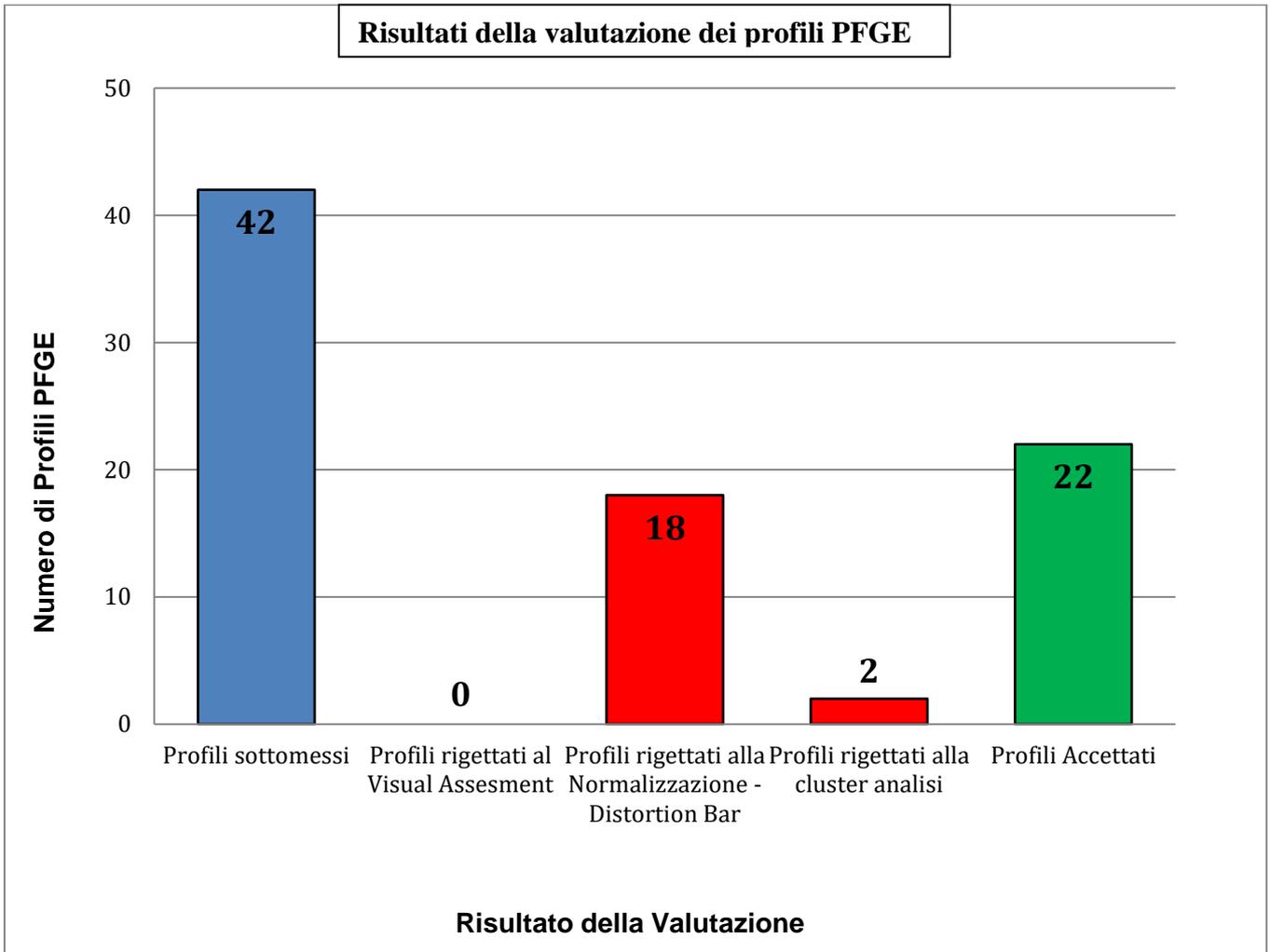


Figura 4. Valutazione a tre step dei profili PFGE sottomessi.

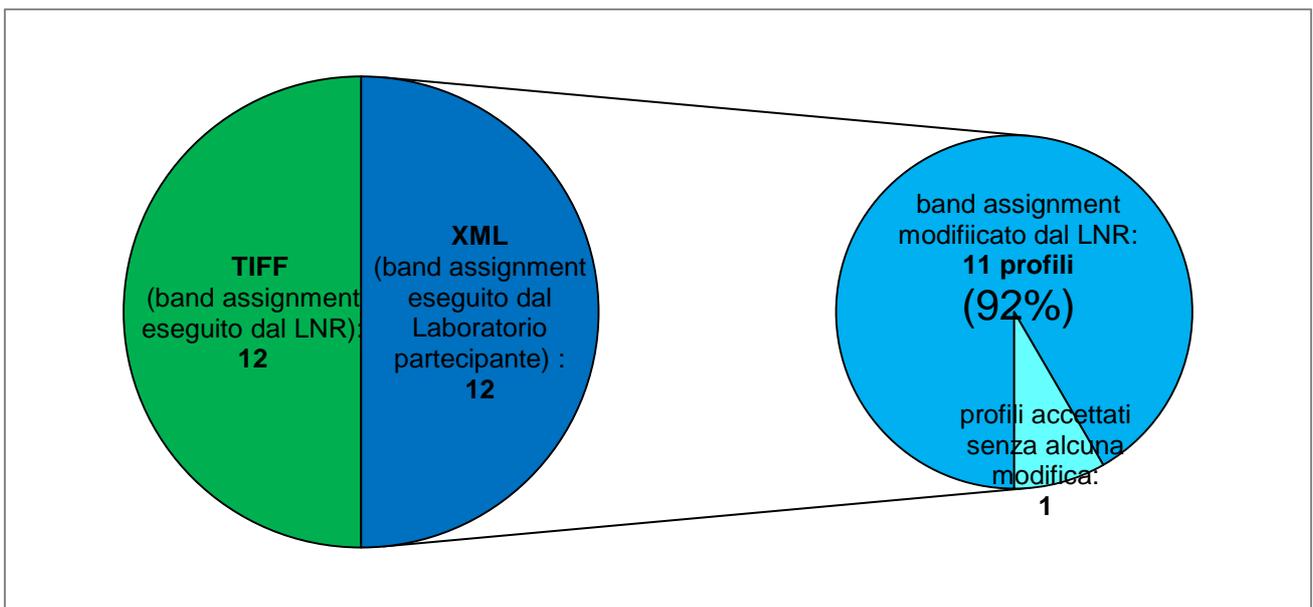


Figura 5. Dettagli della Cluster analisi. Dei 12 profili sottomessi come XML, 11 sono stati sottoposti a modifiche nel band assignment.

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); N. App: Non Applicabile (i profili sono stati sottomessi come immagine TIFF e analizzati direttamente dal LNR).

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	Numero di profili modificati
L199	92,3	97,1	100	100	97,7	95,2	5
L202	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
L664	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
L795	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
L806	100	100	100	97,3	97,7	97,6	6
L807	97,6	100	100	100	100	100	N.App.
L975	97,4	100	97,4	97,3	97,6	97,4	N.App.

Quattro Laboratori hanno presentato profili PFGE ritenuti accettabili e per tre di loro tutti e 6 i 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 Figura 6 mostra la prestazione di ogni laboratorio e la Figura 7 il numero di laboratori, raggruppati secondo il loro punteggio. La prestazione è stata considerata "Insufficiente" per tre Laboratori (43 %), "buona" per un laboratorio (14 %) ed "Eccellente" per tre laboratori (43 %).

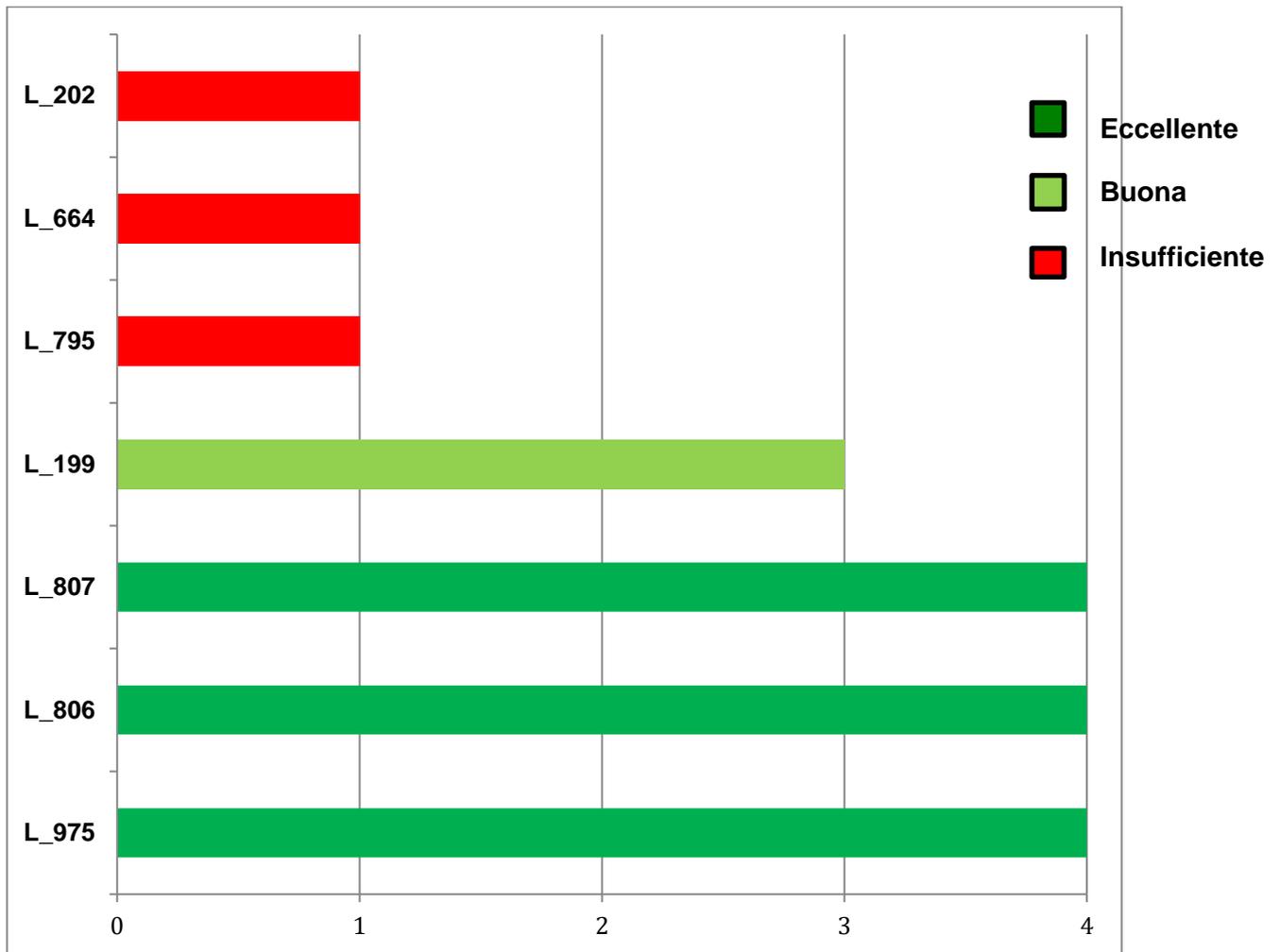


Figura 6. Valutazione della prestazione per ogni laboratorio.

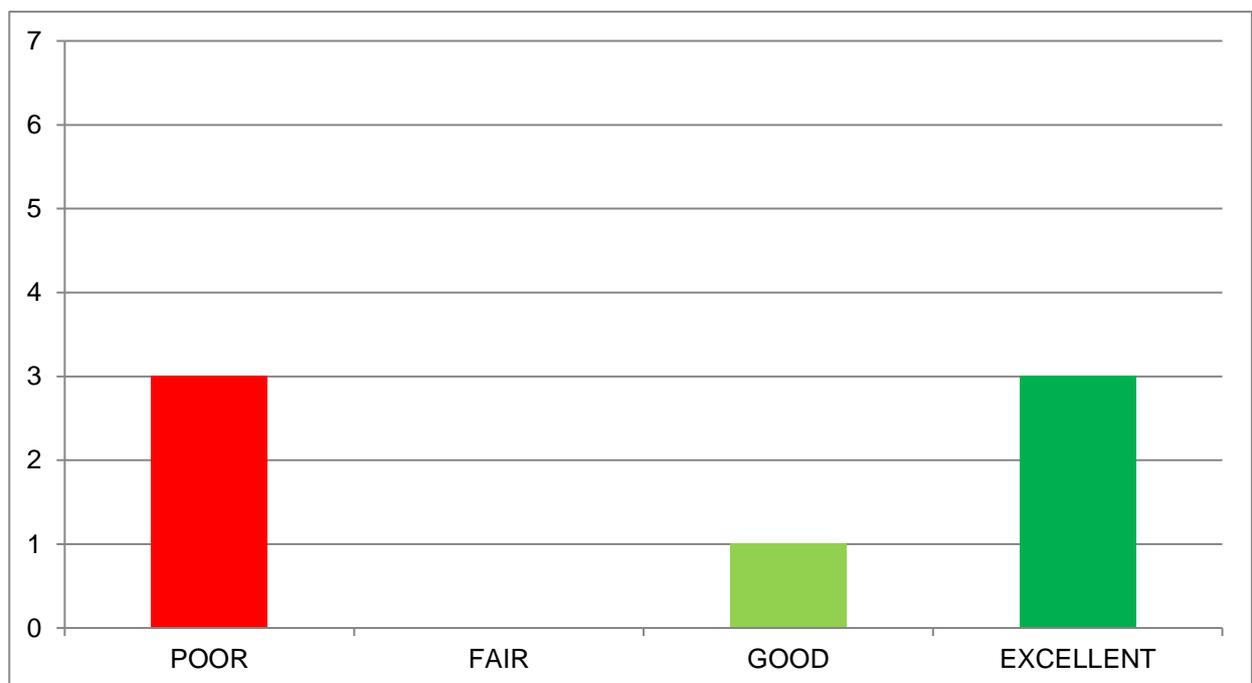


Figura 7. Valutazione globale delle prestazioni dei laboratori. Le barre rosse indicano i laboratori la cui prestazione è stata considerata "Insufficiente".

Le problematiche tecniche riscontrate analizzando le immagini dei gel sono riportate in Figura 8, suddivise per tipologia. L'errato band assignment è relativo ai soli tre laboratori che hanno sottomesso le immagini elaborate dal software e che hanno effettuato l'analisi dei profili. Tutte le altre problematiche sono relative a tutti i gel sottomessi; per cinque laboratori (71 %), sono in particolare relative alla nitidezza delle bande, all'acquisizione dell'immagine ed alla colorazione del gel. Queste criticità sono rilevanti, in quanto influiscono sulla possibilità di assegnare le bande del profilo PFGE.

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

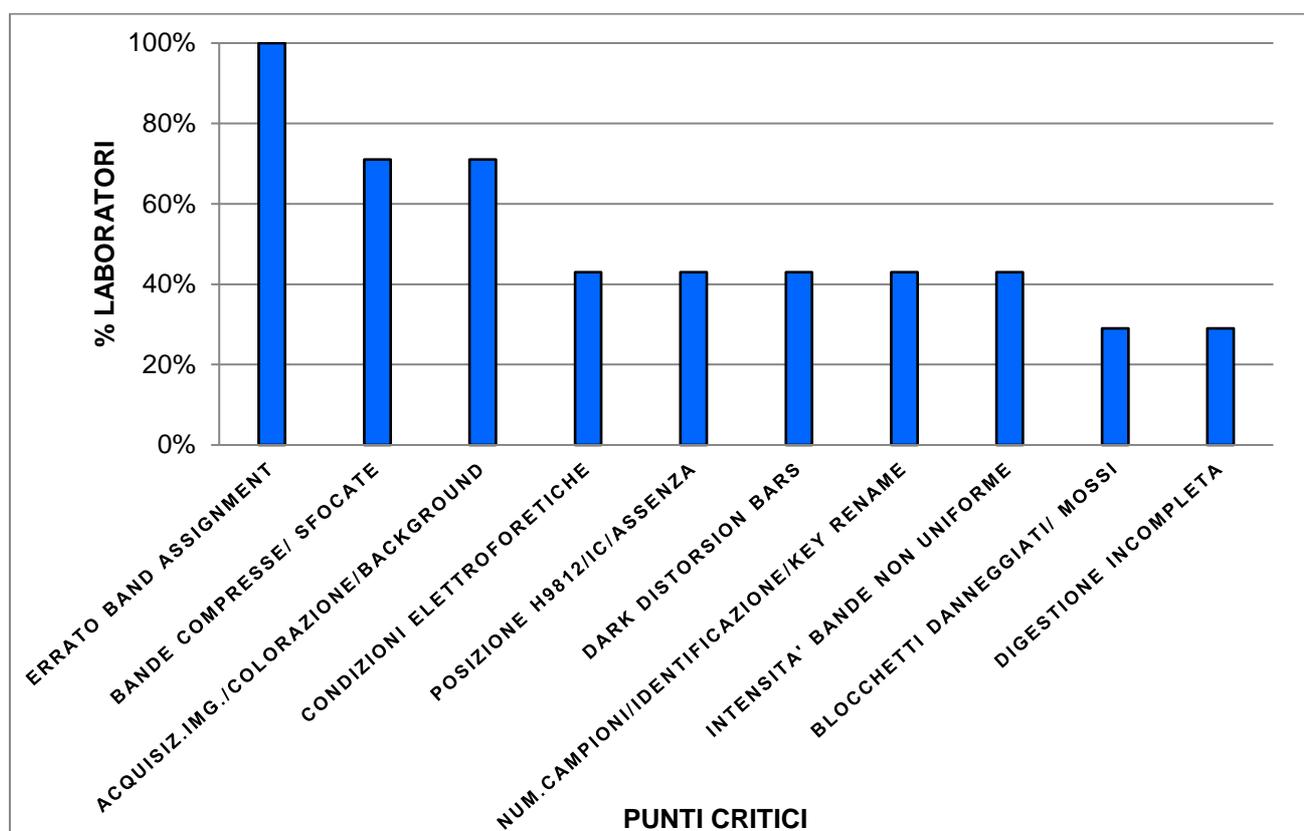


Figura 8. Problematiche tecniche più frequentemente riscontrate analizzando le immagini dei profili PFGE.

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

La valutazione è stata condotta analizzando i file XML inviati e verificando che il laboratorio fosse in grado di importare correttamente i file, impostare il data-base in locale e analizzare i profili secondo le indicazioni inviate dall'LNR. I tre laboratori che hanno condotto l'analisi sono stati quindi categorizzati secondo i criteri descritti nel paragrafo 4.7.2. Il laboratorio L806 rientrava nella categoria C, (l'assegnazione delle bande effettuata dal laboratorio richiedeva modifiche sostanziali per tutti e 6 i ceppi). Il laboratorio L199 rientrava nella categoria D, in

quanto è stato necessario ripetere sia l'assegnazione delle bande che la normalizzazione. Per il laboratorio L202, il file XML presentato non è risultato utilizzabile per la *cluster* analisi, in quanto la normalizzazione era troppo distorta, rientrando quindi nella categoria E.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio inter-laboratorio è parte del programma di VEQ, organizzato dal Laboratorio di Riferimento per l'*E. coli* (Reg. EC 625/2017) per i laboratori designati per il controllo ufficiale, finalizzato a rendere i partecipanti preparati per la raccolta dei dati di sorveglianza molecolare, finalizzati all'attività di monitoraggio delle zoonosi coordinate dall'EFSA.

Questo programma ha raggiunto la sesta edizione, alla quale hanno partecipato un totale di 7 laboratori, dimostrando l'interesse degli Laboratori Ufficiali per la tipizzazione molecolare attraverso PFGE.

Quattro laboratori 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 altri tre laboratori, la prestazione è stata valutata come insufficiente in quanto hanno presentato profili non accettabili, mentre un laboratorio è risultato buono, in quanto purtroppo due dei sei profili presentavano un livello di omologia insufficiente ($\leq 97\%$) 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 tre laboratori che l'hanno effettuata, due hanno dimostrato di essere in grado di effettuare l'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.

Al fine di individuare le aree che richiedono sessioni di formazione dedicate e migliorare le prestazioni, abbiamo effettuato per la prima volta l'identificazione degli errori ricorrenti. Il 43 % dei partecipanti ha presentato 6 errori ricorrenti, principalmente associati alla valutazione visiva. Ciò riflette la complessità della procedura. Tuttavia, la valutazione dei profili attraverso una procedura codificata (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/704e.pdf>) ha permesso di identificare i punti critici da tenere sotto controllo.