



Risultati del 46° studio inter-laboratorio nazionale (PT46) sull'identificazione di *E. coli* produttori di Shiga-tossina (STEC) in campioni di vegetali a foglia - 2026

A cura di:

Paola Chiani, Arnold Knijn, Guendalina Fornari Luswergh, Federica Gigliucci, Federica Melone, Valeria Michelacci, Margherita Montalbano Di Filippo, Stefano Morabito, Rosangela Tozzoli



1. OBIETTIVI DELLO STUDIO INTERLABORATORIO

Lo scopo del PT46 era l'identificazione e l'isolamento di STEC in campioni di vegetali a foglia (insalata lattughino), ed aveva i seguenti obiettivi:

- accrescere l'esperienza dei Laboratori Ufficiali nell'identificazione e nell'isolamento di ceppi STEC da questa matrice;
- fornire supporto ai Laboratori Ufficiali per l'accreditamento del metodo standard ISO/TS 13136:2012;

Questo documento rappresenta il rapporto di valutazione completo dello studio.

2. PARTICIPANTI

Ventisei Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti hanno aderito al PT46. I Laboratori afferivano a 21 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), due Agenzie di Tutela della Salute (ATS), della Brianza e di Milano, due Agenzia provinciale per l'ambiente (ARPA) della Valle d'Aosta e del Friuli-Venezia Giulia e all'azienda USL Toscana Centro.

In particolare, hanno partecipato i seguenti laboratori:

- ATS Brianza, Oggiono (LC)
- ATS Città Metropolitana di Milano
- ARPA Valle d'Aosta, Aosta
- ARPA Friuli-Venezia Giulia, Udine
- Azienda USL Toscana Centro, Firenze
- IZS Abruzzo e Molise, sede di Campobasso
- IZS Abruzzo e Molise, Sede di Pescara
- IZS Abruzzo e Molise, Sede di Teramo
- IZS del Lazio e Toscana, Sede di Roma
- IZS del Lazio e della Toscana, Sede di Pisa
- IZS del Mezzogiorno, Sede di Caserta
- IZS del Mezzogiorno, Sede di Portici
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sede di Bologna
- IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sede di Brescia



- IZS Umbria e Marche, Sede di Fermo
- IZS Umbria e Marche, Sede di Perugia
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino, Biotecnologie
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Torino, Controllo Alimenti
- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sede di Genova
- IZS Puglia e Basilicata, Sede di Foggia
- IZS Puglia e Basilicata, Sede di Putignano
- IZS della Sardegna, Sassari
- IZS della Sicilia, Sede di Palermo
- IZS delle Venezie, Sede di Legnaro (PD)
- IZS delle Venezie, Sede di Cordenons (PN)
- IZS delle Venezie, Sede di Trento

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni

Due campioni di prova (etichettati 1 e 2), ciascuno composto da 25 g di lattughino potenzialmente contaminato da STEC, sono stati inviati in cieco ai Laboratori Ufficiali. L'insalata utilizzata è stata acquistata al dettaglio e conteneva microflora batterica naturale pari a 4×10^4 UFC per grammo di lattuga (2×10^4 UFC di Enterobatteri per grammo di lattuga). L'insalata è stata porzionata in campioni da 25 g in sacchetti stomacher sterili e conservata a +4 °C fino al momento della contaminazione artificiale. Due porzioni da 25 g di lattuga dello stesso lotto sono state inizialmente analizzate per la presenza di STEC applicando il metodo ISO TS 13136:2012. Entrambi i campioni sono risultati negativi per tutti i geni target durante lo screening.

La contaminazione artificiale dei campioni è stata effettuata il 22 maggio 2026, utilizzando opportune diluizioni di una coltura in terreno liquido in fase esponenziale di crescita (0,5 OD a 600 nm) del ceppo STEC ED0963 (O104:H7), che possiede il gene *stx1* ed è negativo per la presenza del gene *eae*. Le caratteristiche dei campioni sono riportate nella Tabella 1.

All'inoculo standardizzato a 0,5 OD è stata associata un'incertezza di misura pari a 0.125 log CFU/ml, calcolata secondo la procedura descritta nella norma ISO TS 19036:2006. Una opportuna diluizione della sospensione di inoculo del ceppo ED0963 è stata aggiunta alle



porzioni di test corrispondenti al campione 2, per ottenere la concentrazione desiderata di inoculo (Tabella 1). L'inoculo usato per lo spiking è stato anche seminato su piastre di agar MacConkey per confermare il titolo.

I set di campioni di test sono stati etichettati con codici numerici generati casualmente, diversi per ogni laboratorio partecipante, e conservati a +4°C fino alla spedizione refrigerata il 25 maggio 2026 tramite corriere. Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di registrare la data di ricezione e la temperatura del campione e di iniziare le analisi immediatamente.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di insalata utilizzati nello studio

Contaminante (<i>Genotipo</i>)	Concentrazione di contaminante	
	Campione 1	Campione 2
Strain ED0963, STEC O104:H7 (<i>stx1+</i> , <i>stx2-</i> , <i>eae-</i> <i>aggR-</i> , <i>aaiC-</i>)	-	50 CFU/25 g

La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state valutate secondo le procedure descritte nel documento ISO 17043.

La stabilità è stata valutata saggiando un set di campioni contaminati il 19 aprile 2026 con il metodo ISO TS 13136:2012 dopo quattro, sei e sette giorni dalla contaminazione iniziale. Lo screening tramite PCR in tempo reale per i geni target STEC e l'isolamento del ceppo STEC in purezza hanno dato risultati positivi con tutti i campioni analizzati fino a sette giorni dalla data di contaminazione.

Durante la preparazione dei campioni di prova da inviare ai laboratori, sei aliquote per ciascuno dei due livelli di contaminazione sono state selezionate casualmente per il test di omogeneità. I campioni sono stati sottoposti ad arricchimento a 37 °C in acqua peptonata e analizzati tramite PCR in tempo reale per la presenza dei geni marcatori del ceppo STEC utilizzato per la contaminazione artificiale, il 26 maggio 2026. I test di omogeneità hanno dato risultati positivi per tutti i geni target associati al ceppo STEC soltanto nei i campioni contaminati artificialmente, come previsto.

3.2. Metodi di Laboratorio



Ai Laboratori partecipanti è stato richiesto di identificare la eventuale presenza di STEC utilizzando il metodo ISO TS 13136:2012, tenendo conto dell'adattamento sviluppato dal laboratorio di riferimento dell'UE per *E. coli* (EURL-VTEC) per la rilevazione specifica di STEC O104:H4 (EURL VTEC_Method_04_Rev 1: "Identificazione di *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) O104:H4 negli alimenti mediante Real Time PCR").

3.3. Raccolta ed elaborazione dei risultati

I risultati sono stati raccolti attraverso la piattaforma SMART, sviluppata dall'EURL per *E. coli*. La scadenza per la sottomissione dei risultati era stata fissata al 15 giugno 2026.

3.4. Valutazione della performance dei Laboratori nella fase di screening delle colture di arricchimento mediante Real Time PCR

La competenza dei Laboratori nell'identificazione dei geni *stx* nelle colture di arricchimento è stata valutata assegnando quattro punti di penalità per ogni risultato errato. Due punti di penalità sono stati assegnati per risultati non corretti relativi alla identificazione del gene *eae* e del gene associato al sierogruppo O104 (*wzx_{O104}*).

3.5 Valutazione della performance dei Laboratori nell'isolamento del ceppo STEC

Le prestazioni di ciascun Laboratorio nell'isolare e caratterizzare il ceppo STEC sono state valutate assegnando due punti di penalità in caso di mancato isolamento di STEC dal campione 2. Non sono stati assegnati punti di penalità ai laboratori che hanno riportato per il ceppo isolato H? o H-, mentre sono stati assegnati 2 punti di penalità ai Laboratori che hanno identificato *fliC* H4 nel ceppo STEC isolato.

3.6 Valutazione della prestazione dei Laboratori nell'intera procedura

La somma dei punti di penalità ottenuti nelle diverse fasi della procedura ha dato origine ad un punteggio totale, utilizzato per valutare la prestazione complessiva dei Laboratori partecipanti. La prestazione dei Laboratori che hanno ottenuto un punteggio superiore a otto era considerata insoddisfacente.

3.7 Valutazione delle caratteristiche prestazionali del metodo



La sensibilità (*Se*) e la specificità (*Sp*) sono state calcolate rispettivamente per le fasi di screening e isolamento utilizzando gli algoritmi descritti di seguito.

Sensibilità: $Se = [\text{veri positivi} / (\text{veri positivi} + \text{falsi negativi})] \times 100$

Specificità: $Sp = [\text{veri negativi} / (\text{veri negativi} + \text{falsi positivi})] \times 100$

4. RISULTATI

I campioni sono stati spediti il 25 maggio 2026 ai 26 Laboratori ufficiali, e tutti i partecipanti hanno riportato i risultati.

La maggior parte dei partecipanti ha ricevuto i campioni in buone condizioni, un Laboratorio ha riportato condizioni “sufficienti” ed un altro ha dichiarato di aver ricevuto i campioni in cattive condizioni (temperatura di ricezione pari a 15°C). Quest’ultimo Laboratorio, tuttavia, ha correttamente identificato il campione positivo per STEC e ha isolato il ceppo STEC contaminante.

I risultati presentati dai laboratori partecipanti sono schematizzati nelle **Figure 1 – 3**.

Figura 1. Proporzione di Laboratori che hanno rilevato correttamente i geni nella fase di screening (a) e di isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC (b) nel campione 2 (verde: risultato corretto; rosso: risultato errato). Tutti i Laboratori partecipanti hanno riportato correttamente negativo per STEC il campione 1.

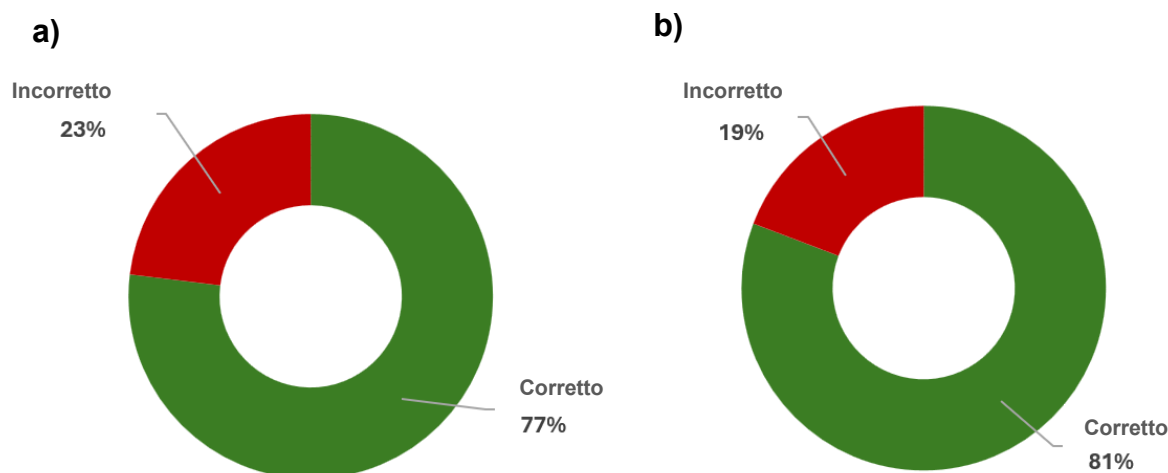




Figura 2. Determinazione della presenza dei geni di virulenza e dei geni associati al sierogruppo nelle colture di arricchimento (riquadri verdi: risultati corretti; riquadri rossi: risultati errati).

Campione 1		Campione 2	
Valore atteso	Campione negativo	Valore atteso	<i>stx1</i> , O104
L008		L008	
L009		L009	
L010		L010	<i>stx1</i> , -
L020		L020	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , -
L021		L021	
L023		L023	
L024		L024	
L028		L028	
L031		L031	
L350		L350	
L422		L422	
L501		L501	
L618		L618	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , -
L684		L684	
L702		L702	
L831		L831	
L909		L909	
L926		L926	
L989		L989	
L990		L990	<i>stx1</i> , -
L991		L991	
L994		L994	<i>stx1</i> , -
L995		L995	<i>stx1</i> , -
L996		L996	
L997		L997	
L998		L998	



Figura 3. Isolamento e caratterizzazione del ceppo STEC dai campioni di insalata.
(caselle verdi: risultati corretti; caselle rosse: risultati errati).

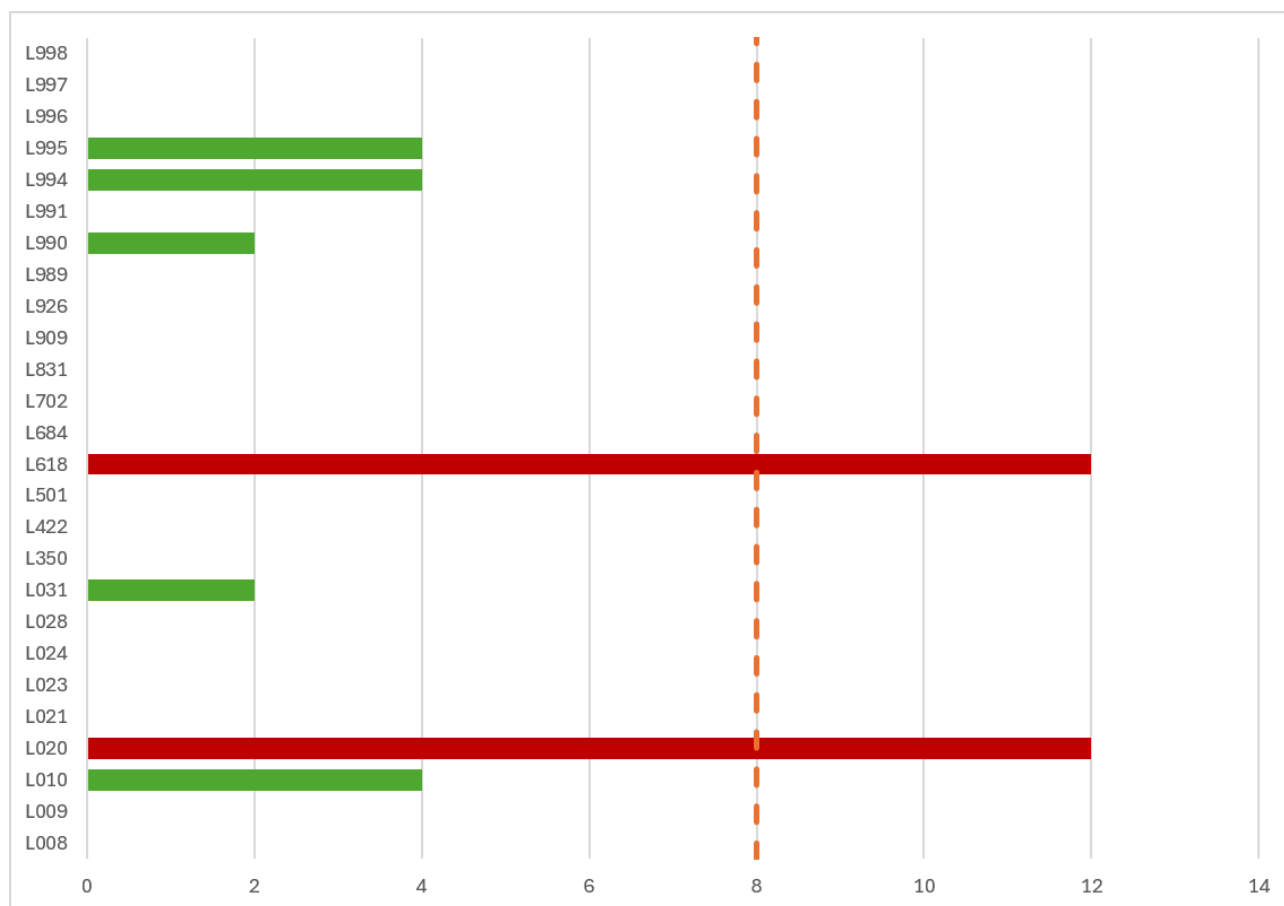
Campione 1		Campione 2	
Valore atteso	Campione negativo	Valore atteso	<i>stx1</i> , O104
L008		L008	
L009		L009	
L010		L010	<i>stx1</i> , -
L020		L020	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , -
L021		L021	
L023		L023	
L024		L024	
L028		L028	
L031		L031	<i>stx1</i> , O104:H4
L350		L350	
L422		L422	
L501		L501	
L618		L618	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , -
L684		L684	
L702		L702	
L831		L831	
L909		L909	
L926		L926	
L989		L989	
L990		L990	
L991		L991	
L994		L994	<i>stx1</i> , -
L995		L995	<i>stx1</i> , -
L996		L996	
L997		L997	
L998		L998	

La *performance* analitica dei Laboratori è stata valutata come indicato in 3.4, 3.5 e 3.6 e la **Figura 4** mostra i punteggi ottenuti dai Laboratori partecipanti, assegnati in base ai risultati non corretti riportati per la fase di screening e di isolamento e caratterizzazione del ceppo



STEC.

Figura 4. Valutazione della *proficiency* dei Laboratori nella fase di screening e di isolamento e caratterizzazione del ceppo isolato. Il punteggio è stato calcolato secondo i criteri descritti ai paragrafi 3.4 – 3.6. La *proficiency* dei laboratori è stata considerata non adeguata a punteggi superiori a 8 (barra rossa).





I Laboratori che hanno ottenuto punti di penalità superiori alla soglia stabilita, L020 e L618, hanno riportato nel campo note l'utilizzo di un kit non in grado di discriminare i geni *stx1* ed *stx2*, ed inoltre non effettuano la ricerca del sierotipo O104:H4.

Sei Laboratori non hanno identificato la presenza del gene associato al sierogruppo O104 nel campione 2 nella fase di screening, ma uno di questi, L990, lo ha identificato nel ceppo isolato. I rimanenti cinque Laboratori hanno informato invece di aver ricercato i sierogruppi oggetto del metodo ISO TS 13136, e di non aver applicato il metodo EURL-VTEC per la determinazione del sierotipo O104:H4.

Un laboratorio ha caratterizzato il sierotipo del ceppo isolato come O104:H4, determinando in maniera non corretta la presenza del gene associato all'antigene flagellare H7, presente in realtà nel ceppo utilizzato per le contaminazioni dei campioni. Tuttavia, alcuni laboratori hanno riportato la presenza di un ceppo di *E. coli* negativo per *stx* con antigene flagellare H4 nelle colture di arricchimento. Il ceppo in questione potrebbe essere stato presente come parte della flora contaminante dei campioni e la sua presenza potrebbe spiegare l'identificazione del segnale relativo al gene *fliC* H4, probabilmente dovuto al mancato isolamento in purezza del ceppo STEC.

Vengono sotto riportati di seguito i risultati del calcolo della specificità e sensibilità dei diversi target.

Per il calcolo della specificità della determinazione del gene *stx2*, sono stati esclusi i risultati riportati dai laboratori L020 ed L618, dal momento che questi laboratori hanno indicato di avere utilizzato un kit che non permetteva di discriminare tra *stx1* ed *stx2*. Per il calcolo della Sensibilità del gene associato al sierogruppo O104 sono stati esclusi i cinque Laboratori che non hanno applicato il metodo EURL-VTEC 04.

Il calcolo di **Se e Sp nella fase di screening** ha restituito i seguenti risultati:

	<i>Campione 1</i>	<i>Campione 2</i>	
	Sp	Se	Sp
<i>stx1</i>	100%	100%	NA
<i>stx2</i>	100%	NA	100%
<i>eae</i>	NA	NA	100%



WZX _{O104}	NA	95.2%	NA
---------------------	----	-------	----

La **Se della fase di isolamento** per il campione 2 è stata calcolata pari al 100 %.

5. CONCLUSIONI

I risultati del PT46 mettono in evidenza un'elevata partecipazione da parte dei Laboratori coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti, che hanno mostrato ottime prestazioni nell'identificazione del ceppo STEC contaminante.

Due Laboratori partecipanti hanno riportato un elevato numero di punti di penalità. Tuttavia, come comunicato dai laboratori stessi, questo è stato dovuto principalmente all'utilizzo di un kit che non permette la discriminazione dei geni *stx1* e *stx2*.

Un'ultima osservazione riguarda la mancata applicazione da parte di alcuni Laboratori del metodo EURL VTEC 04 per la determinazione del sierotipo O104:H4. Si sottolinea che tale metodo è indicato nel Regolamento EU 2073, e nonostante il PT46 non fosse su germogli, matrice per la quale è definito il criterio microbiologico di assenza del sierotipo O104:H4, la sua applicazione era stata richiesta nell'invito dall'EURL per *E. coli*, producendo in questo modo punti di penalità assegnati alla mancata ricerca del sierogruppo O104.