

Il metodo ISO/TS 13136:2012 per la ricerca dei VTEC e l'introduzione della biologia molecolare nei laboratori di microbiologia degli alimenti: ricadute sulla gestione del risultato analitico

Stefano Morabito

EU Reference Laboratory for *E. coli*
including VTEC;

Dipartimento di Sanità Pubblica

Sicurezza degli alimenti: Approccio microbiologico classico

- ✓ 5 Standards colturali per la sicurezza alimentare (1441/07)
- ✓ 1HPLC (1441/07 Istamina)
- ✓ 12 Standards colturali per igiene di processo (1441/07)



Un nuovo paradigma per la sicurezza alimentare

Nuovi Pericoli!

- ✓ Microorganismi non coltivabili (NoV, HAV)
- ✓ Microorganismi che non possono essere distinti dai ceppi non-patogeni appartenenti alla stessa specie (STEC)
- ✓ Microorganismi che presentano nuove combinazioni di geni di virulenza (STEC, EHAEC O104:H4)

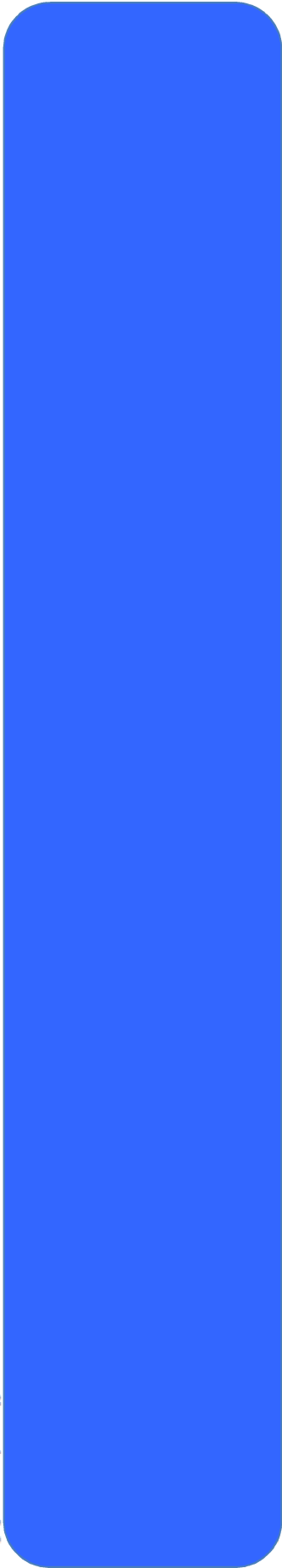
Un nuovo paradigma per il controllo degli alimenti

Nuovi Approcci Analitici!

- ✓ Assenza di strategie colturali selettive e/o differenziali.
- ✓ Identificazione della presenza di target genetici
- ✓ Evidenza **INDIRETTA** della presenza/assenza del pericolo negli alimenti
- ✓ Confusione nella terminologia adottata (es. Presenza presuntiva)

Un nuovo paradigma per il controllo degli alimenti







Microbiology

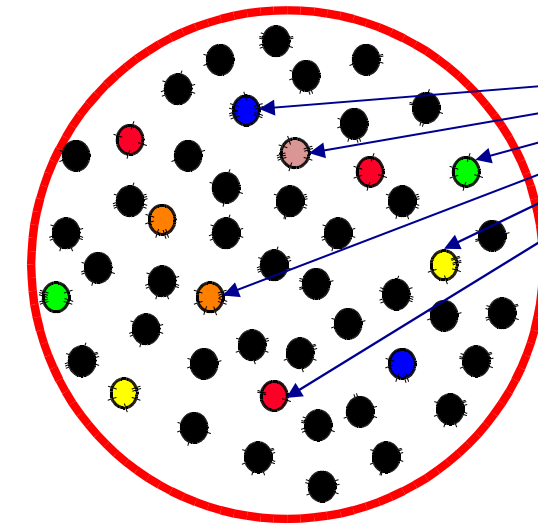


the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing
Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for

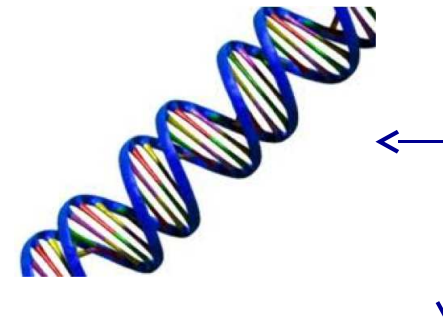
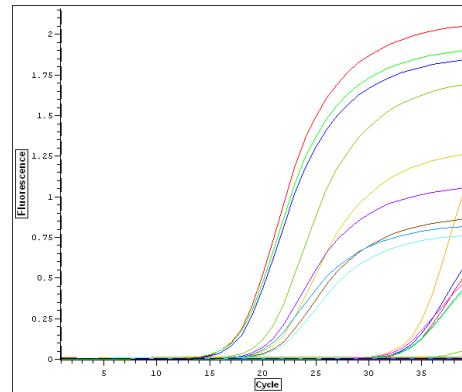
✓ ISO 15189:2013

ISO TS 13136:2012

-  STEC
-  STEC O157
-  STEC O26
-  STEC O103
-  STEC O111
-  STEC O145



Coltura d'arricchimento

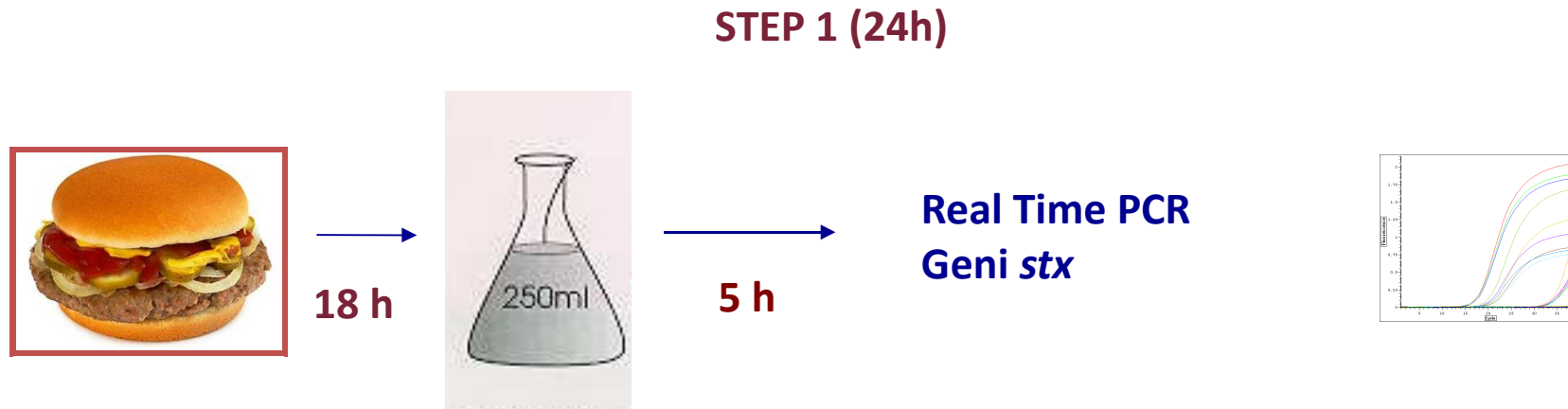


Geni *stx*
Gene *eae*
O26
O103
O111
O145
O157

} geni

**Il metodo ISO TS 13136 contiene le indicazioni
per identificare 8 target genici**

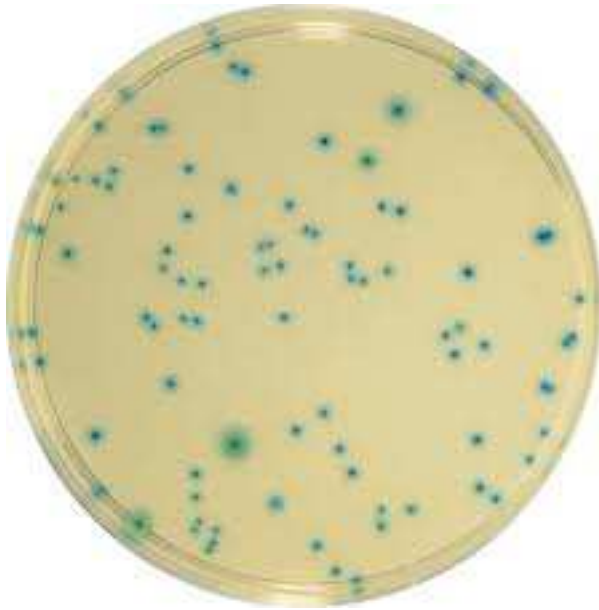
ISO TS 13136: Ricerca di STEC negli alimenti e identificazione dei “top five sergroups”



Campioni Negativi: release!
Target principale: *stx*!

Campioni Positivi: Identificazione presuntiva di VTEC vai all'isolamento- Hold!

Isolamento di STEC da campioni alimentari



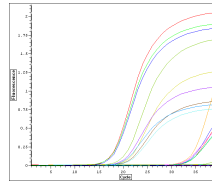
Fino a 50 colonie. PCR Screening
per i geni *vtx*

Lo scopo del metodo ISO TS 13136 è la ricerca di VTEC negli alimenti. La valutazione di pericolosità è stata rimossa dal rapporto di prova e attribuita al
risk manager

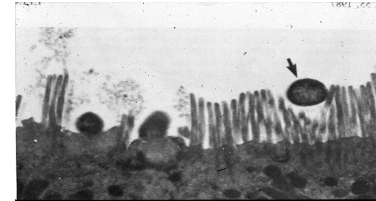
ISO TS 13136: Ricerca di VTEC negli alimenti e identificazione dei “top five sergroups”

STEP 2 (2h)

Real Time PCR
Gene *eae*

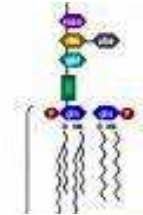
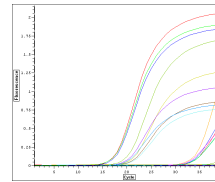


Attaching/Effacing adhesion



STEP 3 (2h)

Real Time PCR
geni di sierogruppo

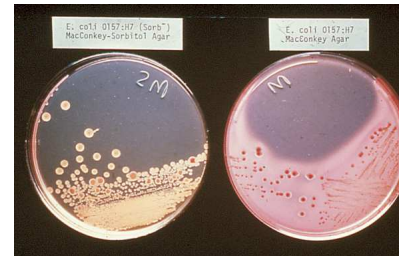
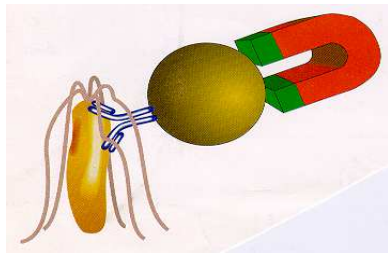


Step 2 e 3: Indirizzare la selezione dei reagenti per l'isolamento. Informativi per i risk managers

Isolamento di STEC “top five” da campioni alimentari

STEP 4 (18 - 20 h)

IMS O-specifica



La nuova versione dello standard ISO TS 13136
esclude l'inferenza sulla patogenicità dei VTEC dal
rapporto di prova

ISO TS 13136: Identificazione Sequenziale

Stx -negativi

Stx -positivi

Stx -positivi

Stx -positivi

Screening eae

eae-negativi

eae-positivi

eae-positivi

Screening 5 Sierogruppi

Release

Isolamento
(screening
colonie per
stx)

Sierogruppo-negativi

Sierogrup-
po-positivi

Isolamento
(screening
colonie per
stx)

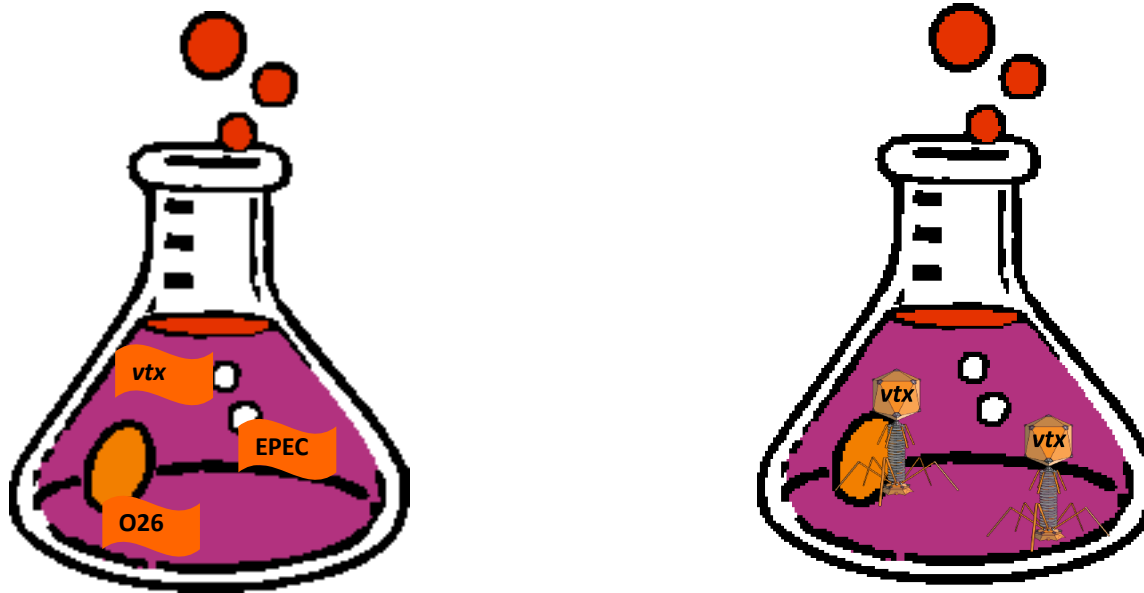
Isolamento
(IMS+
screening
colonie per
stx)



Screening Moleculare Multi-Target

Geni di virulenza e di sierogrupo possono essere presenti in cellule batteriche differenti

Presenza di *stx*-phages liberi nell'arricchimento



ISOLAMENTO E' RICHiesto PER DIMOSTRARE LA PRESENZA DI TUTTI I GENI NELLA STESSA CELLULA BATTERICA VIVA

NOTA SULL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI OTTENIBILI APPLICANDO IL METODO
ISO/TS 13136:2012 NEL RAPPORTO DI PROVA

Campioni positivi allo screening in PCR solo per i geni *stx* in assenza di isolamento:

Presenza presuntiva di STEC/VTEC in x gr o x ml

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* ed *eae* in assenza di isolamento:

Presenza presuntiva di STEC/VTEC in grado di causare la lesione intestinale
attaching/effacing (A/E) in x gr o x ml

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* ed *eae* e positivi per uno dei geni di sierogruppo inclusi nel campo di applicazione in assenza di isolamento:

Presenza presuntiva di STEC/VTEC di sierogruppo OXX in x gr o x ml (*dove XX rappresenta il sierogruppo che ha dato positività alla PCR*)

**NOTA SULL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI OTTENIBILI APPLICANDO IL METODO
ISO/TS 13136:2012 NEL RAPPORTO DI PROVA**

**Campioni positivi allo screening in PCR solo per i geni *stx*, in caso di successo
nell'isolamento del ceppo *stx*-positivo:**

Presenza di STEC/VTEC in x gr o x ml

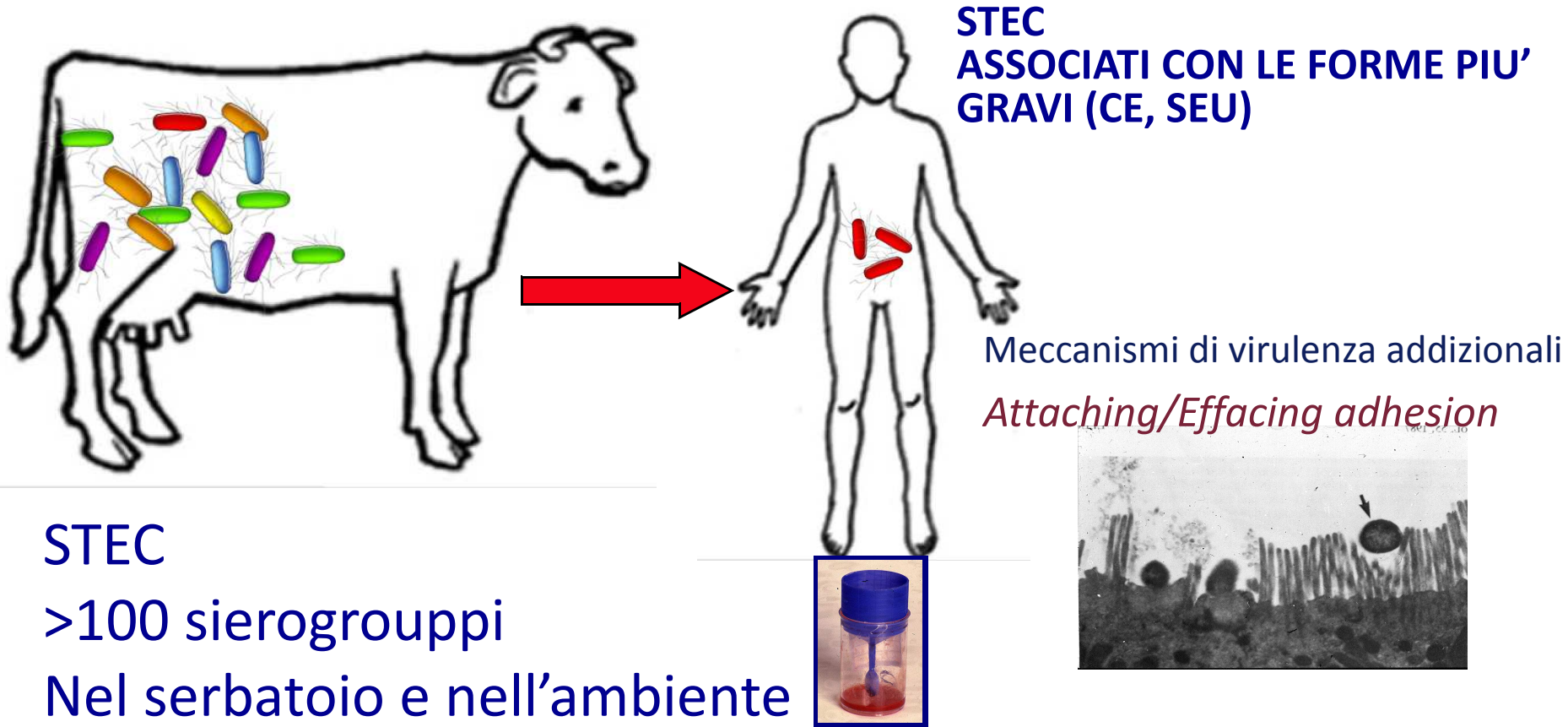
**Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* ed *eae*, in caso di successo
nell'isolamento del ceppo *stx+eae*-positivo:**

Presenza di STEC/VTEC in grado di causare la lesione intestinale *attaching/effacing* (A/E)
in x gr o x ml

**Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* ed *eae* e positivi per uno dei
geni di sierogruppo inclusi nel campo di applicazione, in caso di successo
nell'isolamento del ceppo *stx+eae*-positivo appartenete al sierogruppo identificato
nello screening in PCR:**

Presenza di STEC/VTEC di sierogruppo OXX in x gr o x ml (dove XX rappresenta il
sierogruppo che ha dato positività alla PCR)

STEC e patogenicità: Visione empirica



O157
O26, O111, O103, O145,

STEC e patogenicità: Visione olistica

Table 11: Virulence markers in the seropathotype concept as proposed by Karmali et al. (2003)

Sero-patho-type	Incidence in human disease ^(a)	Outbreaks	Association with severe disease ^(b)	Virulence markers		Serotypes
				<i>vtx</i>	<i>eae</i>	
A	High	Common	Yes	<i>vtx2</i> (but may in addition also carry <i>vtx1</i>)	+	O157:H7, O157:NM
B	Moderate	Uncommon	Yes	<i>vtx1</i> and/or <i>vtx2</i>	+	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM
C	Low	Rare	Yes	<i>vtx1</i> and/or <i>vtx2</i>	+/-	O91:H21, O104:H21, O113:H21, O5:NM, O121:NM, O165:H25
D	Low	Rare	No	<i>vtx1</i> and/or <i>vtx2</i>	+/-	Multiple ^(c)
E	Non-human only	NA ^(d)	NA ^(d)	<i>vtx1</i> and/or <i>vtx2</i>	+/-	Multiple ^(c)

(a): Reported frequency in human disease.

(b): Haemolytic uraemic syndrome (HUS) or haemorrhagic colitis (HC).

(c): See Table 1.

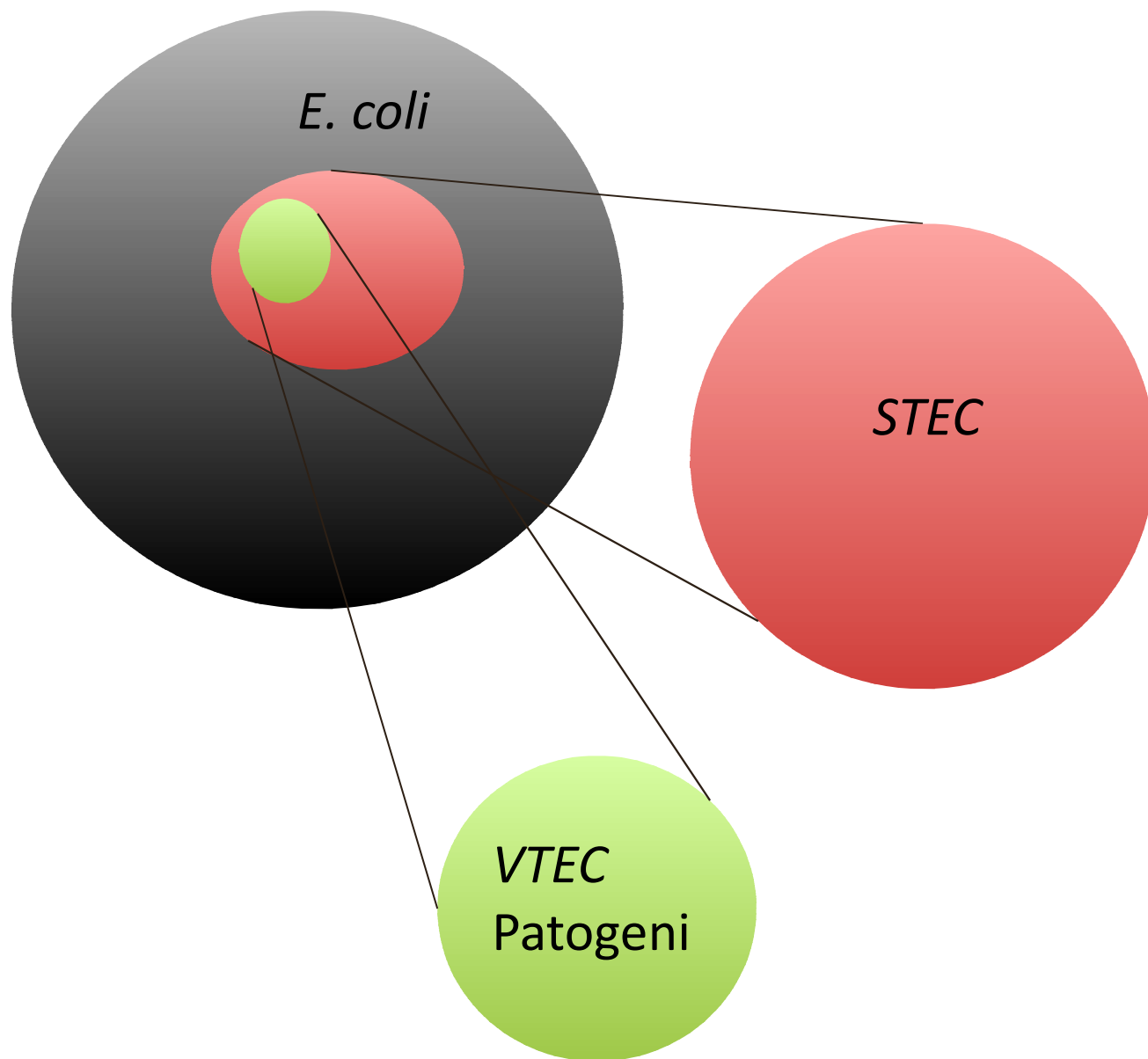
(d): NA = not applicable.

STEC e sicurezza alimentare: una visione più ampia è necessaria!

- ✓ I sierogruppi che causano SEU sono in evoluzione continua
- ✓ STEC *eae*-positivi possono essere non associati alla malattia grave
- ✓ STEC *eae*-negativi possono essere associati alla malattia grave
- ✓ La diarrea è comunque una patologia

I VTEC sono una popolazione estremamente eterogenea dal punto di vista patogenetico e nei caratteri identificativi!!

Quali STEC identificare??



Regolamenti Europei per la Sicurezza Alimentare

Il **‘Pacchetto Igiene’** comprende regole su:

- Igiene degli alimenti
- Regole di igiene specifiche per gli alimenti di origine animale
- Criteri Microbiologici
- Linee guida sull'applicazione
- Misure transitorie
- Regolamenti a livello degli SM

COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005

of 15 November 2005

on microbiological criteria for foodstuffs

(Text with EEA relevance)

GERMOGLI: Matrice normata

12.3.2013

EN

Official Journal of the European Union

L 68/19

COMMISSION REGULATION (EU) No 209/2013

of 11 March 2013

amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and the sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat

(Text with EEA relevance)

(c) the following row 1.29 and the corresponding footnotes 22 and 23 are added:

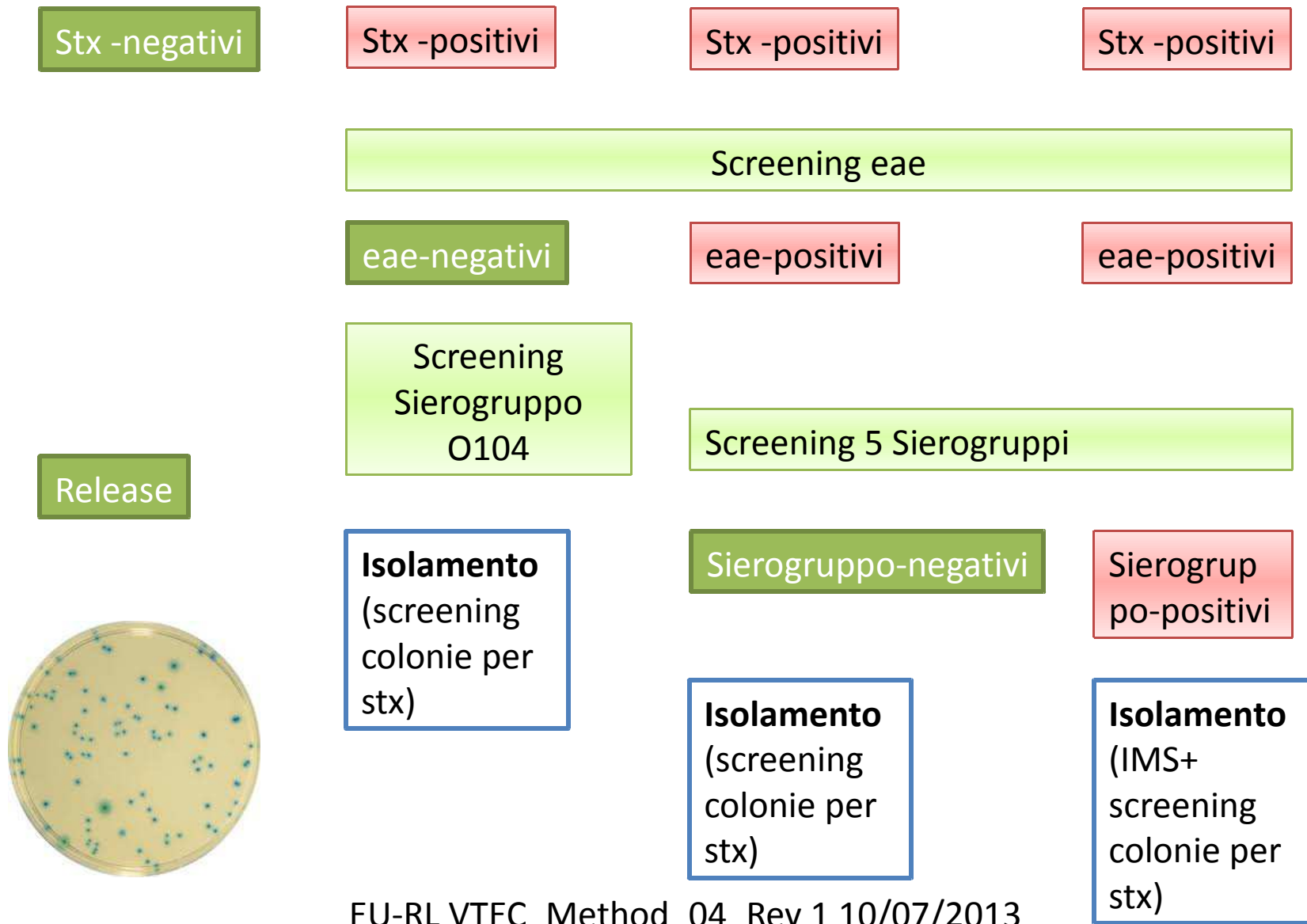
1.29 Sprouts ⁽²³⁾		5	0	Absence in 25 grams	CEN/ISO TS 13136 ⁽²²⁾	Products placed on the market during their shelf-life
------------------------------	--	---	---	---------------------	----------------------------------	---

⁽²²⁾ Taking into account the most recent adaptation by the European Union reference laboratory for *Escherichia coli*, including Verotoxigenic *E. coli* (VTEC), for the detection of STEC O104:H4.

⁽²³⁾ Excluding sprouts that have received a treatment effective to eliminate *Salmonella* spp. and STEC;

Controlli in vigore dal 1st Luglio 2013

ISO TS 13136: Adattamento per Reg 209/2013



ISO TS 13136:2012 è un metodo universale

Lo scopo del metodo ISO TS 13136 è la ricerca di STEC negli alimenti. E' destinato ai **laboratori**.

Non è una valutazione del rischio
(prerogativa del **Risk Assessor**)

Non contiene valutazioni di **conformità** per le matrici
non normate in quanto questa prerogativa è
attribuita al **Risk Manager**

Ricerca di STEC negli alimenti non normati

Aumento dei test per STEC dopo la crisi

O104

Aumentata consapevolezza del pericolo



✓ Trend positivo

RASFF notifications VTEC



Non supportata da regole certe

DRAFT Scientific Opinion

Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment

Published on April the 9th, 2013

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)

- ✓ ...Pathogenicity can neither be excluded nor confirmed for a given STEC serogroup or serotype based on the seropathotype concept or analysis of the public health surveillance data. **IL SIEROGRUPPO NON E' UN FATTORE DI VIRULENZA**
- ✓ ~~There is no single or combination of marker(s) that defines the potential of a~~
- ✓ I geni che codificano le Verocitotossine sono l'unico determinante di virulenza riconosciuto.
- ✓ Fattori aggiuntivi (legati al meccanismo di colonizzazione) sono probabilmente associati con un quadro sintomatologico più severo.
- ✓ GIUSTIFICA L'APPROCCIO DELL'ISOLAMENTO BASATO SUI GENI Stx
- ✓ Grado di "virulenza" in relazione al profilo di rischio degli alimenti (linee guida infection period), and dose-related factors may also be of importance.

DRAFT Scientific Opinion

Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment

Published on April the 9th, 2013

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)

- ✓ **L'opinione non contiene criteri microbiologici (Gestione del rischio) ma fa considerazioni di patogenicità e di rischio su alcune matrici -ready to eat- (valutazione del rischio)**
- ✓ **Può fornire un razionale per il Risk Manager (AC ed OSA) per definire criteri nazionali (AC) o associati al singolo processo (OSA)**
- ✓ **Utilizzata in alcuni SM in assenza di regolamenti**
- ✓ **Documento di riferimento per le linee guida in discussione alla CE**

Analisi per STEC: Gestione del Rischio

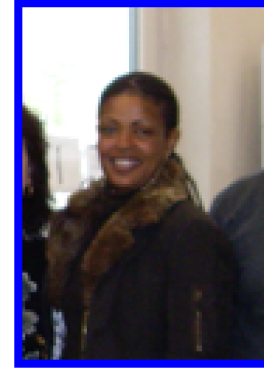
Reg 209/2013, Recital 12: Indicazioni sulla gestione del rischio?

...Certain STEC serogroups (namely O157, O26, O103, O111, O145 and O104:H4) are recognized to be those causing the most of the Haemolytic Uremic Syndrome (HUS) cases occurring in the EU. Furthermore serogroup O104:H4 caused the outbreak in May 2011 in the Union. Therefore microbiological criteria should be considered for these six serotypes. **It cannot be excluded that other STEC serogroups may be pathogenic to humans as well. In fact, such STEC may cause less severe forms of disease such as diarrhoea and or bloody diarrhoea or may also cause HUS and therefore represent a hazard for the consumer's health.**

In conclusione.....

- ✓ La ISO TS 13136 è il metodo di riferimento per la ricerca di VTEC in matrici normate (germogli) e non normate (carni)
- ✓ La ISO TS 13136 è comunque l'unico standard per questi patogeni e rappresenta la migliore strategia possibile
- ✓ Le complesse modalità di riportare i risultati analitici consentono (se seguite correttamente) in realtà di produrre rapporti di prova informativi per il “Risk Manager”
- ✓ Le linee guida potrebbero contribuire a facilitare l'adozione di misure in caso di positività
- ✓ Il Risk Manager rimane l'unica figura deputata alla gestione del rischio

Grazie per l'attenzione!



The EU-RL VTEC folks