

COPIA

ASS 13/12/13

REGIONE
PIEMONTE

Direzione Sanità
Settore Prevenzione e Veterinaria
sanita.pubblica@regione.piemonte.it

DECASTRELLI
ABETE
CHIAVACCI
BRUSA
PISTONE
FERRARI
SEARRELLA

Data 10 DIC. 2013

Protocollo 27609 DB2017

Protocollo n°

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE - TORINO			
ANNO	TITOLO	CLASSE	FASC.
	X1	3	
0020985 13/12/13			
U.O.R.	C.C.		
SA			

Ai Servizi Veterinari ed al SIAN
delle ASL del Piemonte

S e d i

All'Istituto Zooprofilattico del Piemonte,
Liguria e Valle d'Aosta

S e d i

e, p.c. Al Ministero della Salute
Direzione generale per l'igiene e la sicurezza
degli alimenti e la nutrizione

All'Istituto Superiore di Sanità
Centro di riferimento VTEC

S e d e

OGGETTO: Indicazioni operative per l'interpretazione dei rapporti di laboratorio a seguito di analisi per la ricerca di E.coli VTEC su alimenti ed in animali destinati alla produzione di alimenti e provvedimenti da adottare a seguito di non conformità.

L'attenzione crescente verso le infezioni da *E.coli* VTEC richiede la definizione di un quadro di interventi che consenta, da parte delle autorità competenti locali, di operare in linea con gli obblighi e gli obiettivi previsti dal Reg. CE 882/2004, tenendo conto della valutazione del rischio che, ad oggi, considera, quale parametro di sicurezza alimentare, l'isolamento di *E.coli* produttori di tossina Shiga (STEC o VTEC) O157, O26, O111, O103, O145 e O104 con la compresenza di specifici geni di patogenicità.

La Regione Piemonte con l'emanazione del "Protocollo Tecnico per l'effettuazione dei controlli microbiologici sugli alimenti e l'interpretazione e gestione degli esiti analitici", ha ritenuto di estendere tale criterio anche agli alimenti di origine animale individuando quale parametro di non conformità la "presenza di *E.coli* VTEC" secondo la norma ISO/TS 13136:2012, scelta confermata dal Reg. UE 209/2013 per i germogli.

Via Lagrange, 24
10123 - Torino
Tel. 011/4321515
Fax 011/4322570

Rev 1 - 9 dicembre 2013

L'evoluzione delle tecniche di laboratorio, che prevedono per gran parte delle ricerche screening immunoenzimatici o biomolecolari finalizzati ad individuare in prima battuta i campioni sicuramente negativi evitando costosi procedimenti di isolamento, rende talvolta particolarmente complessa per il personale delle ASL la lettura dei rapporti di prova. È questo il caso delle analisi per la ricerca di *E.coli* VTEC per le quali sono emerse difficoltà interpretative che si ritiene opportuno chiarire anche alla luce degli approfondimenti prodotti da un apposito gruppo di studio regionale.

Secondo l'EFSA, i **criteri per la definizione di campione positivo e quindi non conforme** a seguito di analisi effettuate secondo la norma ISO/TS 13136:2012 sono i seguenti:

- Alimenti prelevati nel corso di programmi di **monitoraggio/sorveglianza** e non collegati direttamente ad episodi di tossinfezione alimentare: isolamento colturale di *E.coli* VTEC appartenente al sierogruppo O157, O26, O103, O145, O111 oppure O104, in combinazione con la presenza dei geni STX e eae.

L'Autorità Competente Locale deve verificare nel rapporto di laboratorio i risultati della prova sulla base dei seguenti passaggi riportati per come dovrebbero attualmente essere indicati dall'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta:

- STECPAT Screening per geni di patogenicità STX e eae: in caso di negatività il risultato è **conforme**; in caso di positività il laboratorio prosegue il processo analitico;
- STECSIE Screening per la ricerca del *sierogruppo*: in caso di negatività il risultato è **conforme**; in caso di positività il laboratorio prosegue il processo analitico;
- STECISO Isolamento del batterio: in caso di mancato isolamento, il risultato è **conforme**; in caso di isolamento il laboratorio prosegue il processo analitico;
- STECPAT Screening per geni di patogenicità STX e eae *sulle colonie isolate*: in caso di negatività il risultato è **conforme**; in caso di positività il campione va considerato **non conforme**.

I geni di virulenza e i geni associati ai sierogruppi di *E.coli* VTEC possono essere presenti anche in altre cellule batteriche. Nella coltura di arricchimento potrebbero essere presenti anche dei fagi STX liberi. L'isolamento colturale è necessario per dimostrare la presenza nella stessa cellula batterica vitale di tutti i geni rilevati.

- Alimenti prelevati sulla base di **correlazioni epidemiologiche in caso di tossinfezione alimentare (MTA)** potenzialmente legata ad una infezione da *E.coli* VTEC (Decisione 2012/506/EU):
 - *isolamento di un ceppo di *E.coli* in grado di produrre shigatossine o con la presenza dei geni STX1 o STX2 oppure*
 - *isolamento di un *E.coli* O157 non fermentante il sorbitolo oppure*
 - *identificazione diretta, senza isolamento del batterio, dei geni STX oppure*
 - *identificazione dei geni STX direttamente dall'alimento senza isolamento del batterio.*

Nell'ambito dello studio effettuato dal gruppo di lavoro sono state richiamate le indicazioni dall'EFSA che prevedono che la ricerca di *E.coli* VTEC dovrebbe essere effettuata esclusivamente su alimenti *ready-to-eat*, escludendo dalla ricerca gli alimenti sottoposti a trattamenti termici in grado di inattivare il batterio o da consumarsi previa cottura, individuati tenendo conto anche delle indicazioni rese disponibili ai consumatori ai sensi



del Reg. CE 178/2002 o sulla base di specifiche indicazioni normative. È questo il caso ad esempio della commercializzazione di latte crudo presso la stalla, dove gli attuali programmi di campionamento non hanno tenuto conto dell'introduzione dell'obbligo di informazione del consumatore e che risultano pertanto non più in linea con una appropriata valutazione del rischio.

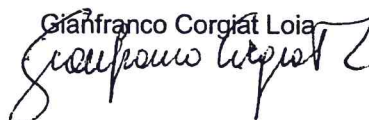
Sono inoltre state individuate, sulla base di una revisione della letteratura, le misure da adottare a seguito del riscontro di *E.coli* VTEC sia nel corso di controlli ufficiali sugli alimenti, sia nell'ambito di programmi di ricerca o di piani di monitoraggio nelle feci di animali destinati alla produzione di alimenti o nell'ambiente dove tali animali sono allevati. Tali misure sono riportate nella linea guida allegata alla presente nota.

Al fine di evitare difformità di comportamento sul territorio si richiamano pertanto le ASL e l'IZS ad attenersi a quanto previsto dalla presente nota, dal protocollo tecnico e, per il laboratorio, anche dalle norme tecniche di accreditamento applicabili, evitando iniziative unilaterali che possano creare difficoltà interpretative.

Eventuali problematiche andranno segnalate allo scrivente settore che provvederà a valutarle e ad adottare gli eventuali correttivi.

Distinti saluti.

Il responsabile del Settore

Gianfranco Corgiat Loia


<p align="center">LINEE GUIDA PER I PROVVEDIMENTI DA ADOTTARE A SEGUITO DI POSITIVITÀ PER <i>E.COLI</i> VTEC</p>

NON CONFORMITÀ PER *E.COLI* VTEC NEGLI ALIMENTI

In presenza di un rapporto di prova del laboratorio con un esito che rientri nelle definizioni di positività previste dalla norma ISO/TS 13136:2012, l'Autorità competente dovrà procedere come segue:

- 1) per gli alimenti "ready to eat": adozione dei provvedimenti sanitari previsti dal regolamento CE n.882/2004 e dal regolamento CE n.178/2002 (blocco della commercializzazione, individuazione e rimozione delle cause, ritiro e richiamo dal mercato, ecc). Ai sensi dell'articolo 55 del regolamento CE n.882/2004 e della vigente normativa nazionale, deve essere attivata la procedura sanzionatoria (notizia di reato).
- 2) per gli alimenti destinati ad un successivo trattamento termico in grado di inattivare il batterio è necessario adottare i provvedimenti di biosicurezza finalizzati a ridurre la diffusione del patogeno nell'allevamento di origine con le modalità di seguito riportate.

NON CONFORMITÀ PER *E.COLI* VTEC IN ANIMALI DESTINATI ALLA PRODUZIONE DI ALIMENTI

In presenza di un rapporto di prova del laboratorio con un esito che rientri nelle definizioni di positività previste dalla norma ISO/TS 13136:2012, l'Autorità competente provvederà ad adottare provvedimenti sanitari finalizzati a ridurre la diffusione del patogeno in allevamento e ridurre il rischio di esposizione umana nelle successive fasi di produzione di alimenti.

Sulla base dei fattori di rischio individuati dalla revisione della letteratura vengono adottati, in relazione alle diverse situazioni, uno o più dei seguenti provvedimenti di biosicurezza:

- pulizia e disinfezione straordinaria di mangiatoie e abbeveratoi con cadenza quindicinale durante tutto il periodo estivo (maggio-ottobre);
- verifica e rimozione delle situazioni di possibile contaminazione fecale di acqua di abbeverata e mangime;
- evitare il pascolo e la somministrazione di erba fresca da terreni in cui sia stata effettuata la fertirrigazione nello stesso periodo estivo (tale foraggio dovrebbe essere destinato a fienagione);
- fertirrigazione e spandimento di letame solo dopo almeno 60 giorni di stoccaggio;
- mungitura dei soggetti positivi da effettuarsi dopo tutti gli altri, con particolare attenzione ad evitare contaminazioni fecali ed alla successiva pulizia e disinfezione della sala mungitura;

- nel caso si tratti di latte destinato "crudo" alla produzione di formaggi, intensificare le analisi in autocontrollo per assicurare l'assenza di contaminazione da *E.coli* VTEC;
- nel caso si tratti di fattoria didattica, sospensione delle visite da parte di bambini per l'intera durata del periodo estivo o messa in atto di uno specifico protocollo finalizzato all'attuazione di misure igieniche (lavaggio delle mani con frequenza, evitare il contatto con animali, strutture, alimenti crudi, ecc);
- riduzione al minimo dell'imbrattamento del mantello degli animali inviati al macello;
- indicazione nelle Informazioni sulla Catena Alimentare (ICA) della positività per *E.coli* VTEC nelle feci per gli animali riscontrati positivi e inviati alla macellazione nel periodo estivo (maggio-ottobre) in cui sia stata riscontrata la positività; tali animali, al macello, dovranno essere sottoposti a macellazione con particolare attenzione a ridurre i rischi di contaminazione fecale delle carni.

Le misure potranno essere revocate al termine del periodo considerato a rischio (1° novembre) oppure a seguito di analisi negative effettuate dall'OSA in autocontrollo su un numero idoneo di campioni.

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

Destinata ai laboratori che operano il controllo ufficiale degli alimenti, la presente nota intende chiarire le modalità da adottare per una corretta espressione dei risultati analitici ottenibili applicando il metodo ISO/TS 13136:2012, ai fini della corretta redazione del Rapporto di Prova conseguente all'analisi ufficiale degli alimenti e della corretta interpretazione del risultato da parte dell'Autorità Competente.

La redazione della presente nota tiene conto di tutti i risultati che è possibile ottenere sia nella fase di screening molecolare del metodo che nella combinazione delle fasi molecolari (screening) e microbiologiche (isolamento).

Si precisa che la presente nota è la traduzione fedele della sezione 10 del metodo ISO/TS 13136:2012 (*Expression of results*) integrata con interpretazioni del LNR per *E. coli* finalizzate ad una migliore comprensione del testo.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI ANALITICI

Campioni negativi allo screening in PCR per i geni *stx*:

Assenza di STEC/VTEC in x gr o x ml

Si richiama l'attenzione sul fatto che, per i campioni di alimenti negativi allo screening per i geni *stx*, il metodo ISO/TS 13136:2012 non prevede di effettuare le successive analisi finalizzate alla ricerca del gene *eae* o dei geni sierogruppo-associati.

Le analisi effettuate nell'ambito di focolai epidemici possono seguire una logica differente: in quei casi, la ricerca del gene *eae* o dei geni di sierogruppo-associati può essere effettuata anche sui campioni di alimenti negativi allo screening per i geni *stx* se ritenuto opportuno. In ogni caso, il rapporto di prova riporterà la formulazione proposta nel metodo ed esplicita in questa nota e conterrà nelle note la presenza di eventuali geni o l'isolamento di un ceppo *stx* negativo ma positivo per i geni *eae* o sierogruppo-associati.

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*)

Si richiama l'attenzione sul fatto che per i campioni di alimenti positivi allo screening per i geni *stx* ma negativi per il gene *eae* non è necessario effettuare le analisi finalizzate alla ricerca dei geni di sierogruppo.

Nel caso in cui si abbia successo nell'isolare il ceppo di *E. coli* responsabile delle positività in PCR si riporta la presenza non più presuntiva con la seguente formulazione:

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 inPCR:

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