



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

Campionamento e metodi per esami virologici, STEC e botulino

Sarah Lovari

*Laboratorio di Biotecnologie applicate agli alimenti
DO Microbiologia degli alimenti
IZSLT*



Procedure Operative Standard IZSLT
Norme di Riferimento: ISO/protocolli CNR
Matrici da campionare
Esiti: interpretazione

Virus: Norovirus Genogruppo GI e GII
Epatite A (HAV)

STEC: *Escherichia coli* produttori di shigatossine
Clostridium botulinum

Salmonella, listeria e campylobacter

☀️ **Criteri microbiologici:**
REGOLAMENTO (UE) N. 209/2013 DELLA COMMISSIONE
dell'11 marzo 2013
che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda i criteri microbiologici applicabili ai germogli (...)

☀️ **Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei Regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004**

☀️ **Aggiornamento piano regionale di campionamento degli alimenti di origine animale destinati al consumo umano 2015-2019.**
Programmazione 2019.

per il 2019 sono inserite nel piano le seguenti nuove ricerche (riportate in dettaglio nei paragrafi successivi):

- analisi relative a microrganismi indicatori di igiene nelle diverse matrici già oggetto di campionamento (*Escherichia coli*, *Enterobatteriacee*, *Stafilococchi coagulasi positivi*, *Bacillus cereus*) in stabilimenti di produzione
- ricerca di *Salmonella* anche nelle matrici 1) Carni fresche di pollame 2) Uova fresche e prodotti a base di uova crude (anche in relazione ai criteri di sicurezza stabiliti dal Reg. UE 2073/05) 3) Collagene
- ricerca *Campylobacter* spp. in formaggi
- ricerca *Vibrio* potenzialmente patogeni in prodotti ittici pronti al consumo
- **ricerca del Virus dell'epatite A in molluschi bivalvi vivi**
- ricerca dell'Idrossimetilfurale (HMF) nel miele
- ricerca Diossine e Policlorobifenili in grassi e oli di origine animale



**POS MIC 045 NOR
NOROVIRUS GENOGRUPPO GI, NOROVIRUS GENOGRUPPO GII,
VIRUS EPATITE A (HAV)
(PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION - QUALITATIVA)**

ISO/TS 15216-2: 2013 Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and Norovirus in food using real-time RT-PCR.
Part 2: Method for qualitative detection.

**Individua la presenza del genoma virale dei virus
oggetto dell'analisi**

Matrici previste dalla ISO 15216: **quali**



ISO/TS 15216-2: 2013 salad vegetables

ISO/TS 15216-1:2017 leaf, stem and bulb vegetables

piante a foglia, a stelo o a bulbo consumate in insalata



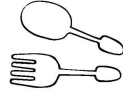
Frutti di bosco-soft fruits: piccoli frutti commestibili senza nocciolo



Molluschi bivalvi: cozze, vongole, lupini, ostriche, cannolicchi



Acquisti in bottiglia



Superfici alimentari: la superficie degli alimenti, le superfici per la preparazione degli alimenti o di contatto con essi



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

Nell paragrafo SCOPO della ISO 15216 è dichiarato che:

Il metodo non è validato per l'identificazione dei virus target in altre matrici alimentari , come ad es. gli alimenti complessi, o in ogni altra matrice non inclusa tra quelle specificate o per identificazione di altri target virali

Matrici previste dalla ISO 15216: **come** (1)

I vegetali a foglia, a stelo o a bulbo e i frutti di bosco
da sottoporre ad analisi possono essere



freschi o congelati

non devono essere stati sottoposti ad altri trattamenti
se non quelli di taglio, lavaggio, decontaminazione o
condizionamento (es. insalata IV gamma)



Matrici previste dalla ISO 15216: come (2)

I molluschi bivalvi da sottoporre ad analisi
possono essere



vivi o congelati

Ma **non** devono essere stati sottoposti a cottura o
ad altri trattamenti termici

Matrici previste dalla ISO 15216: quanto (1)



L'analisi di frutti di bosco e vegetali da insalata è effettuata su una porzione di 25 gr



Quantità da campionare: **ALMENO 100 gr**

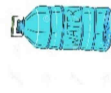


L'analisi dei molluschi bivalvi è effettuata a partire da 2 gr di epatopancreas

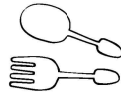
Quantità da campionare: 1 Kg* (meglio 2 Kg) e non meno di 10 soggetti

* previsto dalle LINEE GUIDA per IL CONTROLLO UFFICIALE ai sensi dei regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004

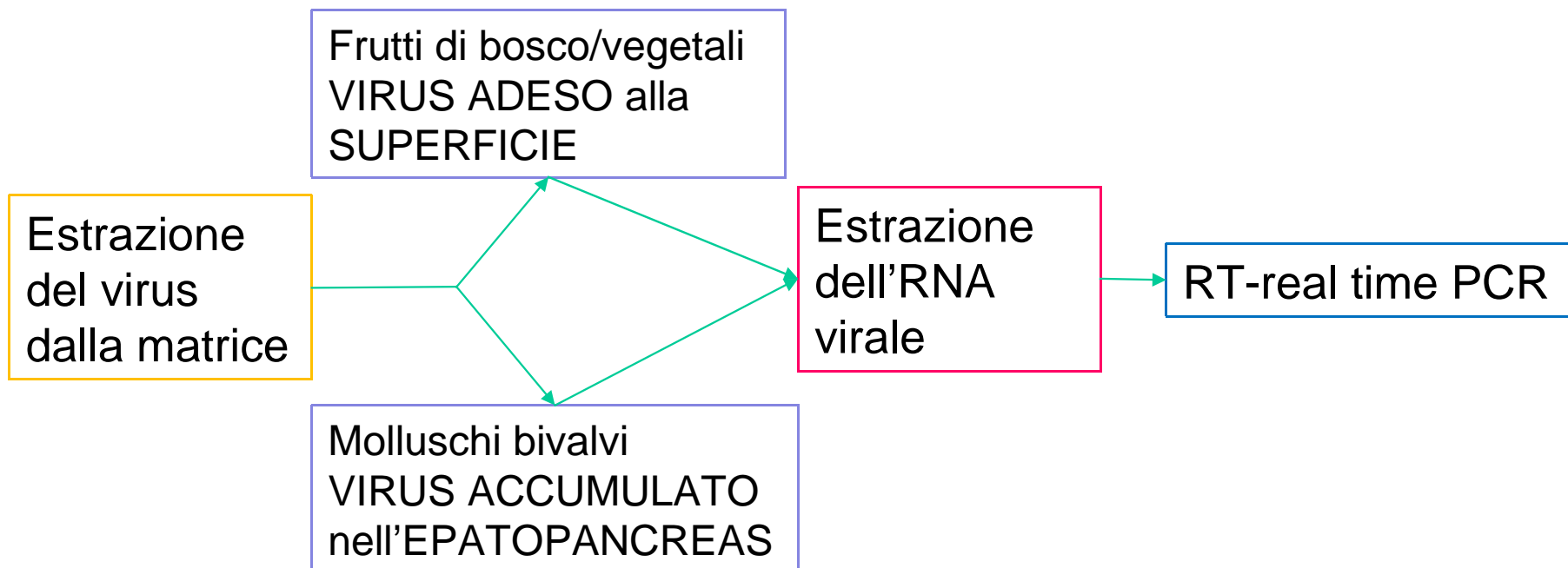
Matrici previste dalla ISO 15216: quanto (2)



15216-1: 2017: volume fino a 2 l
15216-2: 2013: volume compreso tra 0,3 l e 5 l



Tampone sterile pre-inumidito con PBS
Tamponare energicamente (per staccare eventuali particelle virali) una superficie di massimo 100 cm²
Registrare l'area tamponata in cm²
Inviare il tampone senza liquido, meglio se congelato



Rapporto di Prova

11 Test report

The test report shall contain at least the following information:

- all information necessary for the complete identification of the sample;
- the sampling method used, if known;
- the test method used, with reference to this part of ISO/TS 15216 [ISO/TS 15216-2:2013];
- all operating details not specified in this part of ISO/TS 15216, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the test result(s);
- pLOD (3.17) of the method (adjusted to account for use of 10^{-1} RNA if appropriate) and the matrix it was established in;
- the tLOD (3.16) of the sample;
- the extraction efficiency of the sample (2.4);
- the test result(s) obtained, expressed according to Clause 10.

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE

MITILI (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)

PROVA: VIRUS EPATITE A (HAV) - TECNICA: PCR REAL TIME REVERSE TRASCRPTION

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		RNA Virale Non rilevata presenza
				Note
				Analisi effettuata a partire da 2gr di tessuto epatopancreatico
				tLOD: 40 copie genoma/gr
				pLOD: 11 copie genoma/reazione
				Eff Estraz. = 20.59%

Prova/Matrice	Metodo di Prova
VIRUS EPATITE A (HAV) (PCR REAL TIME REVERSE TRASCRPTION)-MITILI (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)	ISO/TS 15216-2: 2013 (escluso par 6.10c, 6.14, 6.16, 6.17, 6.18, 8.2.3, 8.2.5)

Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

Campioni oggetto delle prove: 1

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE

MITILI (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)

PROVA: VIRUS EPATITE A (HAV) - TECNICA: PCR REAL TIME REVERSE TRASCRPTION

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		RNA Virale INCONCLUSIVO
<p><u>Il campione è risultato inconclusivo a causa di un'efficienza di estrazione inferiore all' 1 %</u></p>				

Prova/Matrice	Metodo di Prova
VIRUS EPATITE A (HAV) (PCR REAL TIME REVERSE TRASCRPTION)-MITILI (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)	ISO/TS 15216-2: 2013 (escluso par 6.10c, 6.14, 6.16, 6.17, 6.18, 8.2.3, 8.2.5)

«no result» «invalid» per :

- Efficienza di amplificazione non accettabile – frutti di bosco
- Efficienza di estrazione inferiore 1% - molluschi bivalvi

- Efficienza di amplificazione non accettabile

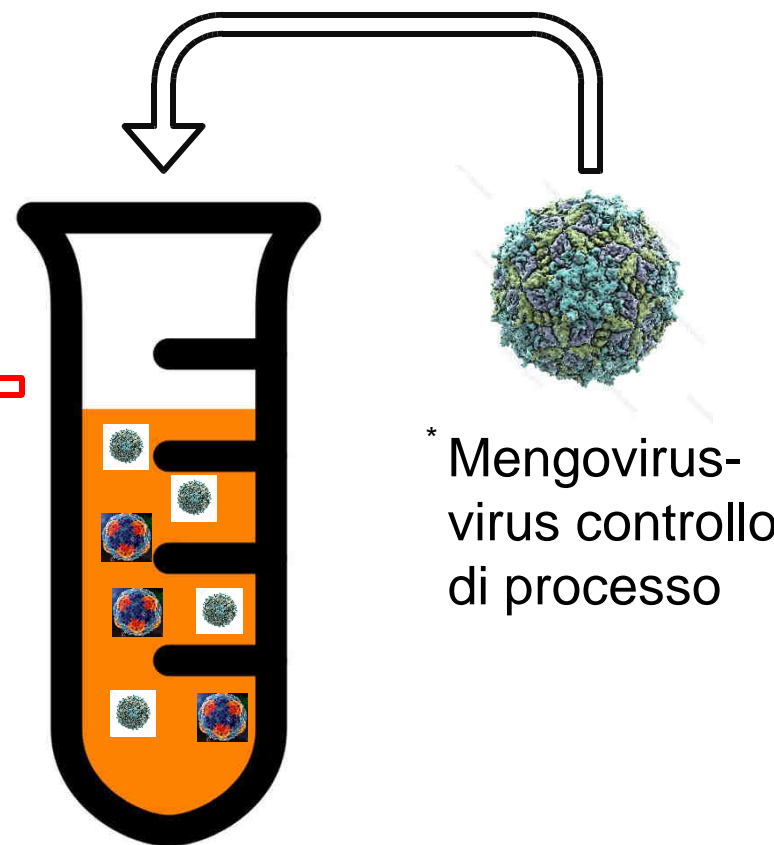
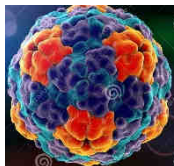
CAUSA: la presenza di inibenti la reazione di RT-PCR real time nel campione

La diluizione campione può migliorare l'efficienza di amplificazione grazie alla conseguente diluizione degli inibenti

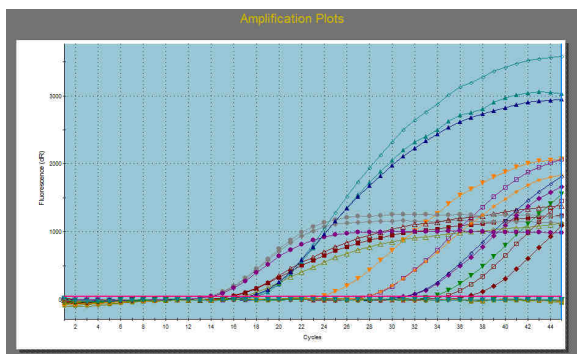
NOTA: nella prossima revisione della ISO 15216 l'efficienza di amplificazione potrebbe essere espressa come INIBIZIONE della RT-PCR real time

Efficienza di estrazione

**** Virus Epatite A**



* Meningovirus-
virus controllo
di processo



Confronto quantità virus controllo di
processo con curva standard

*www.alamy.com

**<https://it.dreamstime.com>

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE

MITILI (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)

PROVA: VIRUS EPATITE A (HAV) - TECNICA: PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		RNA Virale INCONCLUSIVO

Il campione è risultato inconclusivo a causa di un'efficienza di estrazione inferiore all' 1 %

Prova/Matrice
VIRUS EPATITE A (HAV) (PCR REAL TIME
REVERSE TRANSCRIPTION)-MITILI (MYTILUS
GALLOPROVINCIALIS)

Metodo di Prova
ISO/TS 15216-2: 2013 (escluso par 6.10c, 6.14, 6.16, 6.17,
6.18, 8.2.3, 8.2.5)

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE

MITILI (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS)

PROVA: VIRUS EPATITE A (HAV) - TECNICA: PCR REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTION

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito	Note
1	1	1		RNA Virale Non rilevata presenza	

Analisi effettuata a partire da 2gr di tessuto epatopancreatico
tLOD: 40 copie genoma/gr
pLOD: 11 copie genoma/reazione
Eff. Estraz. = 20.59%

Prova/Matrice
VIRUS EPATITE A (HAV) (PCR REAL TIME
REVERSE TRANSCRIPTION)-MITILI (MYTILUS
GALLOPROVINCIALIS)

Metodo di Prova
ISO/TS 15216-2: 2013 (escluso par 6.10c, 6.14, 6.16, 6.17,
6.18, 8.2.3, 8.2.5)



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

POS MIC 028 NOR
ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI SHIGATOSSINE-STE
(PCR REAL TIME)

ISO/TS 13136: 2012 Microbiology of food and animal feed - real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups

IMPORTANT — It is necessary to consider any STEC as pathogenic to humans and potentially to cause severe disease depending on both the risk profile of the food commodity (ready-to-eat foods vs. foods intended to be consumed after technological treatment such as pasteurization, cooking etc. used to reduce any bacteria present in the food) and the health status of the subject ingesting the food.

- Moreover, given the high genomic plasticity of this bacterial species, it is possible that novel arrangements of virulence features can give rise to novel sero-pathogroups such as the Shiga toxin-producing enteroaggregative *E. coli* O104 that caused the HUS outbreaks in Germany and France in 2011-05/06. Novel atypical *E. coli* sero-pathogroups can arise from the acquisition of an *stx*-converting bacteriophage by an *E. coli* strain belonging to pathogroups different from STEC.

Such atypical strains fall in the scope of this method and can be efficiently detected as they are positive for the presence of the *stx* genes.



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

IMPORTANTE

E' necessario considerare **ogni ceppo di STEC come patogeno per gli esseri umani** e potenzialmente in grado di causare gravi patologie a seconda sia del profilo di rischio del prodotto alimentare (alimenti ready-to-eat vs. alimenti da consumarsi pastorizzazione, cottura ecc. utilizzati per ridurre la presenza di contaminazione batterica negli alimenti) sia dello stato di salute del soggetto che consuma l'alimento.

Inoltre, data **l'elevata plasticità del genoma** delle specie batteriche, è possibile che nuovi arrangiamenti delle caratteristiche di virulenza dei ceppi possano dare luogo a nuovi sierogruppi patogenici come nel caso dell'enteroaggregativo *E. coli* O104 produttore di Shiga tossine che ha causato l'epidemia di Sindrome Emolitico Uremica (HUS) in Germania e in Francia nel maggio/giugno del 2011.

Questi ceppi atipici rientrano nello scopo di questa procedura e possono essere efficientemente rilevati come positivi per la presenza dei geni *stx*.

Matrici del campo di applicazione

- Alimenti per l'uomo, alimenti per gli animali
- Supporti da campionamento superfici ambienti del settore alimentare
- Ceppi di *Escherichia coli*

Quantità di campione necessarie per effettuare l'analisi:

25gr/25ml

ma si può procedere anche su quantità minori

Step della procedura:

- 1) Arricchimento microbiologico
- 2) Estrazione dell'acido nucleico
- 3) Rilevazione dei geni di virulenza (*vtx/stx*) mediante PCR real time (STEP di SCREENING)

ESPRESSIONE DEI RISULTATI ANALITICI

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

Documento interpretativo ad integrazione del metodo ISO/TS 13136: 2012

http://old.iss.it/binary/coli/cont/Nota_rapporti_di_prova_ISOTS13136.pdf



ASSENZA

Campioni negativi allo screening in PCR per i geni *stx*: **Assenza di STEC/VTEC in x gr o x ml**

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.

PRESENZA PRESUNTIVA

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

*XX rappresenta il sierogruppo che ha dato positività alla PCR

PRESENZA

Campioni **positivi** allo screening in PCR solo per i **geni stx**,
CON 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**,
CON 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
CON 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

*XX rappresenta il sierogruppo che ha dato positività alla PCR

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE				
FORMAGGIO DI PECORA A LATTE CRUDO				
PROVA: ESCHERICHIA COLI STEC - TECNICA: PCR REAL TIME				
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		ASSENZA in 25 g
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	2		ASSENZA in 25 g
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	3		ASSENZA in 25 g
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	4		ASSENZA in 25 g
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	5		ASSENZA in 25 g
Prova/Matrice				
ESCHERICHIA COLI STEC (PCR REAL TIME)-				
FORMAGGIO DI PECORA A LATTE CRUDO				
Metodo di Prova				
ISO/TS 13136: 2012				



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE				
FORMAGGIO OVINO A LATTE CRUDO (PRODOTTO IL 19/03/2019)				
PROVA: ESCHERICHIA COLI STEC - TECNICA: PCR REAL TIME				
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		PRESENZA PRESUNTIVA in 25 g
				Note
				Individuata la presenza di geni <i>stx</i> e del sierogruppo O103, nella coltura di arricchimento, non confermata nelle colonie di <i>E. coli</i> isolate dalla medesima.
Prova/Matrice		Metodo di Prova		
ESCHERICHIA COLI STEC (PCR REAL TIME)- FORMAGGIO OVINO A LATTE CRUDO		ISO/TS 13136: 2012		

- Individuata la presenza di geni *stx* nella coltura di arricchimento, non confermata nelle colonie di *E.coli* isolate dalla medesima.
- Individuata la presenza di geni *stx* ed *eae* nella coltura di arricchimento, non confermata nelle colonie di *E.coli* isolate dalla medesima. Si presume la presenza di un ceppo di STEC in grado di causare la lesione intestinale *attaching/effacing* (A/E).

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE

LATTE BUFALINO

PROVA: ESCHERICHIA COLI STEC - TECNICA: PCR REAL TIME

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		PRESENZA in 25 ml
				Note

Prova/Matrice
ESCHERICHIA COLI STEC (PCR REAL TIME)- ISO/TS 13136: 2012
LATTE BUFALINO

Metodo di Prova

In caso di **presenza** di STEC con positività del gene eae ma senza sierogruppo:

- Individuata la presenza di un ceppo di STEC in grado di causare la lesione intestinale *attaching/effacing* (A/E).

Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

NOTA Regione Lazio del 2 luglio 2014*

Gestione esiti campionamento ufficiale per la sorveglianza di *E.coli* produttori di tossina Shiga (STEC) negli alimenti di origine animale

«Draft guidance document on the application of article 14 of Regulation (EC) n ° 178/2002 as regards food where Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) has been detected»

Comportamento da adottare a seguito degli esiti su campioni ufficiali eseguiti per la ricerca di STEC (per PRIC 2011-2014)

Linee guida sull'applicazione dell'art. 14 del Regolamento (CE) 178/2002/ nel caso di alimenti contaminati da *Escherichia coli* STEC
Prot. ISS 13630/DSA01.10del 03/05/2017



*<http://93.147.174.12/sievweb/wp-content/uploads/coli0001.pdf>



Regolamento (CE) 178/2002

Articolo 14

Requisiti di sicurezza degli alimenti

- 
1. Gli alimenti a rischio non possono essere immessi sul mercato.
 2. Gli alimenti sono considerati a rischio nei casi seguenti:
 - a) se sono dannosi per la salute;
 - b) se sono inadatti al consumo umano.
 3. Per determinare se un alimento sia a rischio occorre prendere in considerazione quanto segue:
 - a) le condizioni d'uso normali dell'alimento da parte del consumatore in ciascuna fase della produzione, della trasformazione e della distribuzione;
 - b) le informazioni messe a disposizione del consumatore, comprese le informazioni riportate sull'etichetta o altre informazioni generalmente accessibili al consumatore sul modo di evitare specifici effetti nocivi per la salute provocati da un alimento o categoria di alimenti.
- 

Alimenti

PROFILO 1

Profilo di rischio **alto**:

- Alimenti pronti al consumo.
- Frequentemente o usualmente consumati senza eliminare il rischio di infezione da STEC
- Alimenti per cui non si hanno dati di rintraccio certi per stabilire a quale categoria appartengano

PROFILO 2

Profilo di rischio **basso**:

- Alimenti destinati a cottura.
- Alimenti sottoposti a trattamenti destinati ad eliminare o ridurre il rischio di infezione da STEC e per i quali al consumatore sia data una chiara informazione in questo senso.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Conforme



Esito: assenza STEC

Esito: presenza presuntiva STEC

Alto profilo di rischio



Non conforme



Esito: presenza STEC
Isolamento ceppo di *E.coli*
con/senza *eae*/sierogruppi



Conforme



Esito: assenza STEC
Esito: presenza presuntiva STEC
Esito: presenza STEC
Isolamento ceppo di *E.coli* senza
sierogruppi BIG 6)

Basso profilo di rischio



Non conforme



Esito: presenza STEC
Isolamento ceppo di *E.coli* con
uno dei sierogruppi BIG 6



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

Alimenti prelevati sulla base di correlazioni epidemiologiche in corso di tossinfezione alimentare (MTA) potenzialmente legata ad una infezione da STEC

Conforme



Esito: assenza STEC

Non conforme



Esito: presenza presuntiva STEC

con/senza eae/sierogruppi

Esito: presenza STEC

Isolamento ceppo di *E.coli* con/senza eae/sierogruppi

LINEE GUIDA PER I PROVVEDIMENTI DA ADOTTARE A SEGUITO DI POSITIVITÀ PER STEC NEGLI ALIMENTI

In presenza di un rapporto di prova del laboratorio con un esito che rientri nelle definizioni di non conformità 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). In particolare per il latte crudo, l'Autorità competente si attiene a quanto specificato nella Determinazione n. B01381 del 09.04.13 "Disposizioni igienico-sanitarie per la gestione ed il controllo della produzione e vendita di latte crudo (per l'alimentazione umana. Sostituzione Allegato A determinazione n.D4370 del 28.11.07"

Profilo 1

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 e valutate di caso in caso.

Profilo 2

PROVVEDIMENTI DA ADOTTARE NEGLI ALLEVAMENTI DI ANIMALI DESTINATI ALLA PRODUZIONE DI ALIMENTI A SEGUITO DI POSITIVITÀ PER STEC

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 a prescrivere provvedimenti sanitari finalizzati a ridurre il rischio di esposizione umana nelle successive fasi di produzione di alimenti :



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019

ISS Prot. ISS 13639/DSAV01.10 del 03/05/2017

«Linee guida sull'applicazione dell'rt.14 Regolamento (CE) 178/2002
nel caso di alimenti contaminati da *Escherichia coli* STEC»

Ribadisce l'importanza della ricerca degli STEC con metodiche molecolari a causa della mancanza di caratteristiche colturali che consentano di distinguere i ceppi STEC da altri *E.coli* commensali ed ubiquitari.

Interpretazioni del risultato «presenza presuntiva»

- 1.Presenza di DNA libero da ceppi di STEC lisati o non più vitali
- 2.Presenza di batteriofagi liberi
- 3.Presenza di un ceppo STEC al di sotto dei limiti di rilevabilità – no terreni di coltura selettivi
- 4.Complexità delle matrici es. formaggi, alimenti lavorati

**POS MIC 038 NOR
GENI PER LE TOSSINE BOTULINICHE
(REAL-TIME PCR)**

CNRB31.010 rev. 0 del 2017

Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR.

I metodi CNRB30.010 e CNRB31.010 possono quindi essere utilizzati dai laboratori che svolgono attività analitiche finalizzate al controllo ufficiale degli alimenti senza ulteriori validazioni, purché il laboratorio verifichi la propria capacità di applicarli correttamente dimostrando di rientrare nei limiti dei parametri forniti nei rispettivi rapporti di validazione.

Matrici del campo di applicazione CNRB31.010

- ✓ Campioni alimentari
- ✓ Mangimi
- ✓ campioni biologici (tessuti, organi interni, feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico)
- ✓ campioni ambientali
- ✓ colture di arricchimento

Matrici del campo di applicazione POS MIC 038 NOR

- ✓ Campioni alimentari
- ✓ Mangimi
- ✓ campioni biologici (tessuti, organi interni, feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico)
- ✓ campioni ambientali
- ✓ colture di arricchimento

Questo metodo individua i geni e non le tossine, quindi un risultato positivo non significa necessariamente la presenza di queste tossine nel campione esaminato.

- Tutti i campioni eccetto quelli provenienti da ferite, devono essere mantenuti in condizioni di refrigerazione preferibilmente non congelati, comunque la temperatura non è un parametro critico ai fini dell' esito analitico.
- Gli alimenti dovrebbero pervenire in laboratorio possibilmente nel loro contenitore originale.
- Per quanto riguarda gli alimenti, le confezioni sospette vanno inviate in laboratorio evitando il più possibile la manipolazione del loro contenuto. In ogni caso il quantitativo ideale per effettuare la ricerca completa di tossine botuliniche e di clostridi produttori di tossine botuliniche è almeno 25 g e/o ml.
- La ricerca verrà eseguita solo in presenza di valori di pH e Aw compatibili con la crescita e tossinogenesi di clostridi produttori di tossine botuliniche (pH > 4.6 e Aw > 0.935).

Fasi della procedura:

- 1) Arricchimento microbiologico: semina del campione da analizzare in idonei terreni colturali di arricchimento al fine di incrementare il numero di cellule di clostridi produttori di tossine botuliniche
- 2) Estrazione dell'acido nucleico
- 3) Amplificazione degli acidi nucleici estratti mediante determinazione simultanea dei geni che codificano per le tossine botuliniche

Le 3 fasi sono ripetute, in caso di esito negativo
a 24 h di incubazione
a 4 gg di incubazione
a 12 gg di incubazione

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE

PESTO GENOVESE

PROVA: GENI TOSSINE BOTULINICHE - TECNICA: PCR REAL TIME

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito	Note
1	1	1		TIPO A,B,E,F : POSITIVO	

**Rilevata presenza del gene codificante la tossina botulinica tipo A
(e/o B e/o E e/o F)**

Prova/Matrice	Metodo di Prova
GENI TOSSINE BOTULINICHE (PCR REAL TIME)- 	ISS CNRB31.010 rev 0 2017

POS MIC 037 NOR

CAMPYLOBACTER SPP (PCR REAL TIME)

In caso di positività alla real time PCR confermare il risultato utilizzando il metodo di conferma: ISO 10272-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. -- Part 1: Detection method partendo dal punto 9.2 di pag. 5.

POS MIC 055 NOR

SALMONELLA SPP (PCR REAL TIME)

In caso di positività confermare il risultato utilizzando il metodo di conferma ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp. partendo dal punto 4.2. di pag. 2.

POS MIC 056 NOR

LISTERIA MONOCYTOGENES (PCR REAL TIME)

In caso di positività confermare il risultato utilizzando il metodo di conferma UNI EN ISO 11290-1:2017 Microbiologia della catena alimentare - Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. - Parte 1: Metodo per la ricerca partendo dal punto 9.2 di pag. 4.

BUON LAVORO



Sarah Lovari

Il controllo ufficiale degli alimenti:
dal campionamento alla gestione delle non conformità
Roma 14/05/2019