



Istituto Superiore di Sanità  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Prot. ISS 13630/DSAV01.10

Risposta al foglio 18202-P

del 03/05/2017

Ministero della Salute  
DGISAN  
0022703-A-31/05/2017



232952746

MINISTERO DELLA SALUTE - D.G.I.S.A.N. -  
UFFICIO 2

V.LE GIORGIO RIBOTTA N. 5

Roma

00144

Att. DR. GIUSEPPE RUOCCO

Istituto Superiore di Sanità  
Prot 22/05/2017-0014673



Class: DSAV 01.10

1

Oggetto: Linee guida sull' applicazione dell'art. 14 del Regolamento (CE) 178/2002 nel caso di alimenti contaminati da Escherichia coli STEC

In relazione alla richiesta di valutazione del rischio della presenza generica di E. coli verocitotossici e dei suoi particolari serotipi sulle diverse tipologie di alimenti, avendo preso visione della documentazione allegata alla richiesta e della letteratura scientifica disponibile, si formulano le seguenti osservazioni:

La procedura analitica per l'identificazione dei ceppi di E. coli verocitotossici (VTEC), anche detti E. coli produttori di Shiga tossine o STEC, negli alimenti (metodo ISO TS 13136:2012), è basata sull'identificazione dei campioni potenzialmente contaminati attraverso la rilevazione della presenza dei geni codificanti le Shiga tossine (Stx) nelle colture di arricchimento. Le Stx rappresentano il principale fattore di virulenza di questo gruppo di E. coli patogeni e la presenza dei geni che codificano queste tossine (stx) è rilevata mediante reazione a catena della polimerasi (PCR), un processo biochimico che consente l'amplificazione di specifiche sequenze geniche qualora queste siano presenti nel campione. Questo passaggio è reso, indispensabile dalla mancanza di caratteristiche colturali e/o fenotipiche che consentano di distinguere i ceppi STEC da altri ceppi di E. coli commensali ed ubiquitari, spesso presenti nei campioni alimentari.

I campioni le cui colture di arricchimento risultano positive per la presenza di geni stx sono considerati "presunti positivi" e devono poi essere sottoposti ad ulteriori procedure volte all'isolamento del ceppo STEC responsabile della positività riscontrata nella coltura di arricchimento. Questo è ottenuto attraverso la semina della coltura stessa su un terreno solido non specifico e il successivo esame delle colonie batteriche isolate, fino a un numero massimo di 50, per la presenza dei summenzionati geni stx.

Il metodo ISO TS 13136:2012 consente agli operatori di facilitare la procedura d'isolamento attraverso la rilevazione, nelle colture di arricchimento, di tratti genetici aggiuntivi. Il metodo consente, infatti, di determinare la presenza del gene codificante un fattore di adesione, l'intimina, denominato eae. Questo gene è presente nei ceppi STEC maggiormente associati con le infezioni più gravi e il riscontro della sua presenza consente di eseguire ulteriori passaggi di screening delle colture di arricchimento, volti a verificare la presenza dei geni associati con i principali sierogruppi STEC che causano la sindrome emolitico uremica (SEU): O157, O6, O103, O111 e O145, tutti sierogruppi positivi per la presenza del gene eae. Quest'ultima determinazione infine permette, in presenza di positività per uno dei menzionati sierogruppi, di utilizzare ulteriori procedure di arricchimento sierogruppo-specifiche che possono facilitare l'isolamento del corrispondente ceppo STEC dalla coltura di arricchimento.

Questa complessa procedura permette di refertare l'analisi in base alle diverse combinazioni di positività riscontrate nelle diverse fasi di screening e di isolamento. In particolare il metodo richiede di esprimere i risultati nel modo seguente (sezione 10 del metodo):

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



Campioni positivi allo screening in PCR per i geni stx in assenza di isolamento: Identificazione/Presenza presuntiva di STEC/VTEC in X g/ml

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni stx ed eae in assenza di isolamento: Identificazione/Presenza presuntiva di STEC/VTEC in grado di causare la lesione intestinale attaching/effacing (A/E) in X g/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: Identificazione/Presenza presuntiva di STEC/VTEC di sierogruppo OXX in X g/ml (dove XX rappresenta il sierogruppo che ha generato la positività in PCR).

Nel caso in cui il laboratorio riesca a isolare il microrganismo responsabile delle positività identificate nelle fasi di screening l'espressione del risultato prevede uno schema analogo ma omettendo il termine presuntiva.

Al fine di facilitare l'interpretazione dei risultati analitici in presenza di una refertazione così complessa si formulano le seguenti osservazioni.

La positività presuntiva (in qualche caso refertata come presunta o sospetta) deriva dall'impossibilità di isolare il ceppo STEC da cui sono originate le positività alle fasi di screening. Questo può avvenire per le seguenti ragioni:

1. Presenza di DNA libero nella coltura di arricchimento derivante da ceppi STEC lisati e/o non più vitali;
2. Presenza di batteriofagi liberi nella coltura di arricchimento. I geni stx sono naturalmente veicolati da batteriofagi, forme virus-simili in grado di infettare stabilmente i batteri inclusi i membri della specie *E. coli*. In questo caso, i geni stx sarebbero presenti all'interno del genoma di un batteriofago che non si trova integrato nel cromosoma di un ceppo di *E. coli* e che, come tale, non produce tossina. Pur permanendo la possibilità ipotetica che questi batteriofagi possano trovare uno stipite di *E. coli* recipiente nella coltura di arricchimento stessa o nell'intestino dell'ospite in seguito ad ingestione, non sono in grado in questo stato di produrre tossina e non sono di per sé infettivi o patogeni per l'uomo;
3. Presenza di un ceppo STEC in bassa carica al di sotto dei limiti di rilevabilità del passaggio culturale del metodo ISO TS 13136:2012 che, come menzionato, non fa uso di terreni di coltura selettivi.

I casi 1) e 2) non configurano una situazione di rischio di infezione da STEC nell'uomo, mentre per quanto riguarda la situazione di cui al punto 3) la valutazione di pericolosità non risulta agevole data la mancanza di dati scientifici circa i livelli di carica infettante per i ceppi STEC, con l'eccezione dei ceppi di sierogruppo O157 e O111. In particolare, nel caso di STEC appartenenti a questi due sierogruppi la dose infettante è stata stimata intorno alle 10 unità formanti colonia (UFC) analizzando alimenti coinvolti in focolai epidemici. È tuttavia importante considerare che gli studi menzionati erano relativi a due singoli episodi e che pertanto le stime ottenute potrebbero non essere estensibili a tutti i ceppi STEC, inclusi ceppi diversi appartenenti agli stessi sierogruppi O157 e O111, considerando l'elevata variabilità che caratterizza questa specie batterica.

In generale, si sottolinea che non è possibile determinare con precisione la causa delle positività presunte che può essere dovuta a una qualunque delle tre cause indicate.

Per quanto riguarda la valutazione delle positività refertate in seguito ad isolamento del ceppo STEC, in aggiunta alla letteratura scientifica, sono stati considerati il report prodotto annualmente dalle agenzie europee EFSA ed ECDC "EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks", pubblicato sulla base dei dati riportati dagli Stati Membri alle due agenzie nell'anno precedente; l'opinione pubblicata da EFSA nel 2013 "Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment" e il regolamento EC 209/2013 contenente i criteri microbiologici per STEC nei germogli.

Gli ultimi dati disponibili sulle infezioni umane riportati ad ECDC dagli Stati Membri UE e relativi agli anni 2013-2015, dimostrano che ogni anno nel periodo considerato sono stati accertati in media circa 3700 casi di infezione riportati da 22 Stati Membri più Islanda e Norvegia. Questo dato non è tuttavia da considerarsi esaustivo poiché la notifica di queste infezioni è effettuata in modo volontario nella maggior parte dei paesi. Inoltre, la diagnosi di infezione da STEC è molto complessa e richiede l'intervento di un laboratorio specializzato spesso non disponibile in sede di analisi di primo livello. In ogni caso, circa il 70% dei casi notificati nel periodo in esame è stato attribuito a infezione con ceppi STEC appartenenti ad uno dei cinque sierogruppi considerati maggiormente associati alle forme di infezione più gravi, O157, O111, O103, O145, O26. Il rimanente 30% dei casi è riportato invece associato a molteplici sierogruppi STEC, la maggior parte dei quali priva del gene eae.

Sulla base di analoghe considerazioni, la Commissione Europea nel regolamento EC 209/2013 riconosce che non si può escludere che ceppi STEC di sierogruppo diverso dai principali cinque (sei nel documento in questione in quanto il



regolamento considera anche il sierotipo O104:H4) siano comunque patogeni per l'uomo e che possano causare forme morbide, rappresentando pertanto un pericolo per la salute (considerazione 12 nel Reg. EC 209/2013).

Infine, il panel BIOHAZ dell'EFSA, nella menzionata opinione del 2013 conclude che non è possibile allo stato attuale delle conoscenze definire a priori quali STEC siano patogeni per l'uomo e quali invece non rappresentino un pericolo. A fronte della complessità analitica e della conseguente incertezza nell'intraprendere azioni correttive in caso di positività per STEC negli alimenti, la Commissione Europea ha sviluppato la bozza di linee guida sull'applicazione dell'articolo 14 del regolamento 178/2002 alla gestione del rischio per STEC, allegata alla richiesta di questo parere, al fine di armonizzare il ricorso al principio di precauzione nei diversi Stati Membri. Questo documento definisce chiaramente che non dovrebbero essere prese in considerazione positività presunte o presuntive per STEC ai fini dell'applicazione di misure restrittive. Infatti, si fa esplicita menzione alla presenza di un isolato positivo per i fattori di virulenza. Inoltre il documento distingue le azioni da intraprendere sulla base del profilo di rischio dell'alimento identificato come contaminato da STEC. Si identificano in particolare due profili di rischio:

1. Profilo di rischio alto (profilo 1) che include gli alimenti pronti al consumo o alimenti frequentemente o usualmente consumati senza un trattamento in grado di eliminare o ridurre il rischio di infezione da STEC;
2. Profilo di rischio basso (profilo 2) che invece include gli alimenti destinati a cottura o ad altro trattamento in grado di eliminare o ridurre il rischio di infezione da STEC e per i quali sia data al consumatore una chiara informazione in questo senso.

Per gli alimenti che cadono all'interno del profilo di rischio 1 azioni correttive dovrebbero essere attuate in presenza di un'evidenza di contaminazione da STEC indipendentemente dal sierogruppo o dalla presenza del gene eae (isolato di E. coli con i geni stx), mentre per quelli che sono ascrivibili al profilo 2 solo la presenza di un ceppo STEC isolato e appartenente ai principali sierogruppi STEC dovrebbe innescare l'adozione di azioni correttive.

#### Conclusioni

In considerazione di quanto sopra esposto si ritiene che l'approccio proposto nelle bozze di linee guida prodotto dalla Commissione Europea, ancorché non ancora approvato, sia condivisibile e si ritiene che possa effettivamente contribuire a mitigare l'esposizione dell'uomo alla possibilità di contrarre infezioni da STEC attraverso gli alimenti. Inoltre si reputa che lo stesso approccio possa contribuire a ridurre la possibilità di contenzioso legale dovuta a positività presuntive di STEC negli alimenti non considerando tale risultato sufficiente per l'adozione di misure correttive

Il Direttore del Dipartimento di Sanità Pubblica  
Veterinaria e Sicurezza Alimentare

(Dr. Umberto Agrimi)