

PIANO DI SORVEGLIANZA SULLA PRESENZA DI E COLI VTEC IN PRODOTTI A BASE DI LATTE : DALLA PRODUZIONE PRIMARIA ALLA TRASFORMAZIONE

OBIETTIVI

L'obiettivo del piano di sorveglianza è quello di stimare la prevalenza di *Escherichia coli* verocitotossici (VTEC) in formaggi a latte crudo, sul territorio della Regione Lombardia e di fornire la chiave di lettura autentica dei rapporti di prova rilasciati dai laboratori in esito ad analisi effettuate in PCR .

L'indagine , oltre a stimare la prevalenza di diversi sierogruppi di VTEC, mira a stabilire la correlazione con la presenza di *Escherichia coli* non VTEC ed Enterobacteriaceae .

Il piano di sorveglianza rappresenta l'occasione per valutare l'impiego di criteri microbiologici al fine di definire modelli utili a stimare la probabilità di contaminazione dei prodotti in questione da parte di batteri enterici patogeni (VTEC) e il reale rischio per il consumatore.

CRITERI DI RIFERIMENTO

- Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare;
- Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali;
- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, e successive modifiche e integrazioni;
- Direttiva 2003/99/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici;
- L. 30/4/1962, n. 283 Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande;
- D.P.R. 26/3/1980, n. 327 regolamento di esecuzione della L. 30/4/1962, n. 283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande;
- D.M. 16/12/1993 Individuazione delle sostanze alimentari deteriorabili alle quali si applica il regime di controlli microbiologici ufficiali;
- D.lgs 28/7/1989, n. 271 Norme di attuazione, di coordinamento e transitorie del Codice di Procedura Penale

DURATA DEL PROGRAMMA COORDINATO DI SORVEGLIANZA

Le attività di campionamento e di rielaborazione previste nell'ambito del piano di sorveglianza sono effettuate a partire dal 1 Gennaio 2014 sino al 31 dicembre 2014.

DEFINIZIONI

Ai fini del presente piano, si intende per:

- 1) "Prodotti lattiero-caseari": i prodotti trasformati risultanti dalla trasformazione di latte crudo o dall'ulteriore trasformazione di detti prodotti trasformati.
- 2) "*eae*". Gene codificante l'intimina, proteina esterna di membrana responsabile dell'effetto di "attaching and effacing" a carico della membrana intestinale umana. La maggior parte dei ceppi di VTEC patogeni per l'uomo è provvisto dell'"*eae*".
- 3) "Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC)". *Escherichia coli* in grado di produrre potenti verocitotossine termostabili (VT) in grado di inibire la sintesi proteica nelle cellule eucariote. Le verocitotossine sono anche note come Shiga toxins (stx). I termini VTEC e STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) sono sinonimi. Le VT sono codificate dal gene *vtx*, e sono costituite da due frazioni (VT1 e VT2), rispettivamente codificate dai geni *vtx1* e *vtx2*.
- 4) "VTEC - positivo". Ai fini della presente piano è considerato VTEC - positivo qualsiasi campione da cui è stato isolato almeno un ceppo di *E. coli* contenente:

- 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 geni stx ma negativi per il gene eae non è necessario effettuare le analisi finalizzate alla ricerca dei geni di sierogruppo.

- 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 appartenente 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)

5) "VTEC sierogruppo positivo". Ogni campione contenente almeno un isolato di ceppo di VTEC appartenente ai sierogruppi, O26, O103, O104, O111 e O145 O157.

6) "VTX". Gene che codifica per la verocitotossina 1 (VT1) o 2 (VT2).

7) "Immissione sul mercato". Così come definito all'articolo 3, paragrafo 8) del Reg. (CE) n. 178/02. Non sono considerati immessi sul mercato i prodotti per i quali il produttore è in attesa del completamento degli accertamenti attuati al fine di verificarne la conformità alla Legge alimentare.

8) "non conformità (NC)". Così come definita all'articolo 2, punto 10 del Reg. (CE) n. 882/04, la mancata conformità alla normativa in materia di alimenti.

CAMPIONAMENTO, ANALISI E REGISTRAZIONE DEI DATI DA PARTE DELLE AUTORITÀ COMPETENTI

Il campionamento è eseguito dal personale dei Dipartimenti di Prevenzione Veterinari (DPV) –

Le modalità di scelta, prelievo e trasporto dei campioni al laboratorio di analisi sono riportate in allegato I, parte A.

I laboratori dell'I.Z.S.L.E.R. competenti territorialmente effettuano le analisi relative al pH e all'attività dell'acqua (a_w), alla presenza di *E. coli* VTEC e alla numerazione di *E. coli* non VTEC ed *Enterobacteriaceae* secondo quanto riportato in Allegato I, parte B.

Se necessario al fine della definizione del corretto criterio microbiologico da applicare, al momento del campionamento vengono registrate tutte le informazioni in merito alla natura del prodotto e alle informazioni comunque fornite al consumatore in merito alle modalità di conservazione, preparazione e consumo del prodotto. I provvedimenti da adottare in caso di analisi non conformi sono descritti in Allegato I, parte C.

Il numero di campioni da prelevare è indicato in Allegato II.

RACCOLTA, VALUTAZIONE, TRASMISSIONE E UTILIZZAZIONE DEI DATI A LIVELLO REGIONALE

L'I.Z.S.L.E.R. raccoglie i risultati delle analisi condotte sui campioni prelevati nell'ambito del piano di sorveglianza. I risultati del piano sono oggetto di una relazione finale trasmessa alla DG Sanità della Regione Lombardia entro il 30 gennaio 2015. Trimestralmente (02 Maggio 2014, 01 Agosto 2014, 02 Novembre 2014) verrà inviato alla DG Sanità della Regione Lombardia un report riassuntivo dell'attività svolta e dei risultati ottenuti al fine di permettere di monitorare l'andamento del piano e di valutare l'opportunità di apportare modifiche allo stesso.

Oltre a quanto previsto al punto precedente, i dati saranno pubblicati anche in una apposita sezione riservata del sito www.ars-alimentaria.it il cui accesso sarà soggetto a definizioni di password riservate all'Autorità competente che ha condotto i campionamenti, per ambito territoriale di competenza, ed alla DG Sanità della Regione Lombardia.

L'attività di controllo condotta dal DPV, i relativi esiti e gli eventuali provvedimenti successivi al rilievo di NC saranno rendicontati nel Sistema Informativo Veterinario al fine di potere disporre di dati aggregati a livello territoriale e regionale.

ALLEGATO I

PARTE A

CAMPIONAMENTO

1. Prodotti da sottoporre a campionamento

1.1. Formaggi a base di latte crudo

Il piano prevede il prelievo di campioni di formaggio ottenuti dalla lavorazione di latte crudo prima dell'immissione in caldaia; in particolare il piano prevede la creazione di sottocategorie di formaggio così rappresentate:

- formaggi a latte crudo con stagionatura inferiore a 60 giorni
- formaggi a latte crudo con stagionatura tra 60 e 90 giorni
- formaggi a latte crudo con stagionatura oltre 90 giorni

Il campione , considerati i rischi della contaminazione , può essere effettuato sulla cagliata dopo l'estrazione .

1.1.1. Modalità di scelta del campione

Il numero di campioni da prelevare è stato calcolato in ottemperanza a quanto riportato nel documento EFSA "Development of harmonised survey methods for food-borne pathogens in foodstuffs in the European Union"; in particolare sono stati considerati i seguenti parametri:

Calcolo della numerosità del campione

Formula:
$$n = \frac{t^2 P (1-P)}{D^2}$$

dove:

- t = distribuzione t
- P = prevalenza attesa nella popolazione
- D = precisione assoluta desiderata

dimensione del campione n

prevalenza attesa P

precisione assoluta desiderata D

Prevalenza attesa (P)	<input type="text" value="0,05"/>	<input type="text"/>
Precisione assoluta (D)	<input type="text" value="0,02"/>	<input type="text"/>

Livello di confidenza prescelto

☒ 95% ☐ 99%

Numerosità del campione

Il numero di campioni necessari è pari a 457 di cui:

- 228 campioni di formaggi a latte crudo destinati ad una stagionatura inferiore a 60 giorni
- 137 campioni di formaggi a latte crudo destinati ad una stagionatura tra 60 e 90 giorni
- 92 campioni di formaggi a latte crudo destinati ad una stagionatura oltre 90 giorni.

1.1.2. Prelievo dei campioni

Al fine di valutare la prevalenza di *E. coli* VTEC nei prodotti allo stabilimento di origine viene utilizzato uno schema di campionamento stratificato proporzionale che tiene conto del numero degli impianti di produzioni presenti sul territorio di competenza.

I campioni attribuiti a ciascuna ASL sono riportati in dettaglio in Tabella 1 Allegato II

2. Modalità di scelta dei campioni

Al fine di valutare la prevalenza di *E. coli* VTEC nelle diverse tipologie di prodotti oggetto del piano, presso ciascun produttore in occasione di un unico sopralluogo, possono venire prelevate matrici diverse.

I campioni oggetto d'indagine devono essere raccolti in modo casuale.

Per tutte le tipologie di campioni oggetto del piano, ogni campione deve avere un peso minimo di 250 g.

Il numero di campioni che deve essere prelevato è riportato nella tabella 1 dell'Allegato II.

3. Attività di campionamento

I campioni sono prelevati in aliquota unica e ciascuna aliquota deve pesare almeno 250 g.

Nel verbale di campionamento indicare come motivo del prelievo "Piano di sorveglianza *E. coli* VTEC 2014". I verbali di campionamento sono redatti secondo quanto disposto dalle procedure aziendali e nel rispetto di quanto previsto dalle norme vigenti.

Devono essere adottate precauzioni in tutte le fasi al fine di evitare qualunque contaminazione crociata nel corso del campionamento.

4. Trasporto dei campioni

Al momento del prelievo il personale del DPV rileva la temperatura di conservazione del prodotto e la riporta sul verbale di prelievo; in tutte le fasi successive al campionamento il prodotto deve essere mantenuto ad una temperatura non superiore a quella indicata dal produttore, a meno che la temperatura rilevata al momento del campionamento sia superiore a questa (vedi sotto).

Durante il trasporto, i campioni sono conservati in contenitori refrigerati a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C, nel rispetto, comunque, della temperatura indicata dal produttore in etichetta e al riparo da qualunque contaminazione esterna.

I campioni congelati e refrigerati devono essere trasportati separatamente; i campioni congelati possono essere trasportati refrigerati congelati o si può permettere lo sbrinamento durante il trasporto. In quest'ultimo caso, la temperatura del campione non deve superare +8 ° C ed a sbrinamento avviato il campione non deve essere più ricongelato.

Tutti i campioni devono raggiungere idealmente il laboratorio entro 24 ore dal prelievo; in casi eccezionali (per esempio weekend e festivi) tale periodo può essere esteso a 72 ore.

Si richiede comunque di far pervenire i campioni al laboratorio territorialmente competente entro le ore 11 del venerdì.

PARTE B

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E METODI DI ANALISI

1. Ricevimento dei campioni

1.1. Regole generali

Al momento del ricevimento dei campioni, i laboratori verificano le informazioni registrate dal campionatore sul modulo di campionamento.

I campioni la cui temperatura di trasporto al momento del ricevimento è superiore a 8 °C ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) sono respinti, a meno che la temperatura rilevata al momento del campionamento non fosse superiore a 8 °C o che, comunque, la temperatura di conservazione prevista per quel tipo di prodotto sia superiore a tale temperatura.

Tutti i campioni sono conservati refrigerati sino alla fine della sessione analitica:

a) alla temperatura di conservazione indicata sull'etichetta dell'imballaggio. Se l'etichetta indica una gamma di temperature, il campione deve essere conservato alla temperatura limite superiore;

b) se non è indicata alcuna temperatura specifica di magazzinaggio, il campione deve essere conservato:

i) alle temperature massime di refrigerazione definite dalla legislazione o dalle raccomandazioni in vigore con una tolleranza di $\pm 2^\circ\text{C}$;

ii) a 8 °C (\pm 2 °C) in mancanza di normative o raccomandazioni in proposito.

2. Preparazione dei campioni e preparazione della sospensione iniziale

La preparazione dei campioni di prova deve seguire le parti pertinenti della norma ISO 6887-1:1999 "Microbiologia degli alimenti e dei mangimi - Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per gli esami microbiologici - Parte 1: Norme generali per la preparazione del sospensione iniziale e diluizioni decimali "(ISO, 1999). In ogni fase, è opportuno evitare la contaminazione incrociata tra campioni e l'ambiente circostante in tutte le fasi di lavoro.

Se l'analisi è interrotta, ad esempio a causa di deviazioni inaccettabili nel processo di analisi, devono essere ottenuti nuovi campioni.

2.1. Ricerca di *Escherichia coli* VTEC

Il laboratorio provvederà ad eseguire lo screening per la ricerca di *E. coli* VTEC (ricerca fattori di patogenicità) mediante PCR real-time, secondo la metodica normata ed accreditata in IZSLER e che, sinteticamente, prevede l'esecuzione della PCR su di brodo di arricchimento (APT) al termine delle prime 24 ore di incubazione; l'esito favorevole determinerà la chiusura della sessione analitica, mentre l'esito sfavorevole (rilevanza dei geni di virulenza) prevede, partendo dal brodo di arricchimento sul quale è stata eseguita la PCR, la ricerca dei sierogruppi di *E. coli* verotossici (O26, O103, O104, O11, O145 O157) sempre tramite PCR real-time e eventuale conferma microbiologica dei positivi secondo quanto previsto dal metodo ISO TS 13136:2011.

Le metodiche di riferimento per la ricerca del *E. coli* VTEC sono:

1. ISO TS 16136:2012 Microbiology of food and animal feed – Real time Polymerase Chain Reaction base d method for detection of food borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O026, O103 and O145 serogroups.

2.2. Numerazione delle *Enterobacteriaceae*

La numerazione delle *Enterobacteriaceae* è effettuata conformemente alla norma EN ISO 21528-2:2004 «Microbiologia degli alimenti — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* — Part 2: Colony count method»

2.3. Numerazione di *Escherichia coli* β glucuronidasi positivo

La numerazione di *Escherichia coli* β glucuronidasi positivo è effettuata conformemente alla norma EN ISO 16649-2 "Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of β glucuronidasi positive *Escherichia coli*— Part 2: Colony count technique at 44°C usin 5 bromo 4 chloro 3 indlyl β d glucuronide (2001)".

3. Analisi del pH e dell'attività dell'acqua (a_w)

La determinazione di a_w e pH deve essere condotta sul campione sottoposto a prova (solo per i formaggi) al momento del suo arrivo al laboratorio. A tale fine, da una o più parti del campione, sarà preparato un quantitativo di prodotto di approssimativamente 20-30 g rappresentativo dell'intera massa edibile.

4. Stoccaggio degli isolati

I ceppi di *E.coli* VTEC confermati dai campioni positivi devono essere inviati presso il Reparto di Tecnologia degli Acidi Nucleici applicata agli alimenti presso la Sede dell'I.Z.S.L.E.R. per le successive fasi di identificazione su base genomica.

PARTE C

PROVVEDIMENTI IN CASO DI ANALISI NON CONFORMI

Il piano è un piano di sorveglianza per poter inquadrare la prevalenza delle positività per Coli VTC nei prodotti a base di latte e soprattutto per poter porre le basi di una corretta analisi del rischio e definire i provvedimenti necessari a tutela della salute pubblica.

Il prelievo deve essere fatto nelle fasi precedenti all'immissione in commercio quando il prodotto è ancora sotto controllo da parte dell'operatore del settore alimentare.

In caso di positività :

- Valutazione dei risultati (in collaborazione con IZS)
- Verifica dei processi di trasformazione dell'alimento e valutazione di una eventuale loro azione sulla presenza dei coli VTC (in collaborazione con IZS)
- Campione ufficiale sul lotto prima della commercializzazione (valutare la rappresentatività) e a seconda esito liberalizzazione e/o risanamento e/o distruzione e/o valutazione degli esiti effettuati in autocontrollo
- Valutazione delle procedure di autocontrollo
- Ripetizioni di ulteriori analisi di controllo

ALLEGATO II

DISTRIBUZIONE CAMPIONI

Dipartimento	<60gg	60-90gg	>90gg
Bergamo	40	18	10
Brescia	40	18	10
Como	20	10	4
Cremona	10	10	15
Lecco	20	15	4
Lodi	15	10	15
Monza Brianza	5	2	0
Milano	3	1	0
Milano1	5	10	0
Milano2	5	5	0
Mantova	5	2	15
Pavia	10	10	0
Sondrio	30	15	15
Varese	5	2	0
Valle Camonica	16	8	4