



# Ministero della Salute

Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza  
degli Alimenti e la Nutrizione  
Ufficio 2 Igiene degli alimenti ed esportazione

Ministero della Salute

DGISAN

0030360-P-21/07/2017



Assessorati alla Sanità delle Regioni  
e Province Autonome  
Servizi veterinari

Ministero della Salute  
Direzione Generale della Sanità Animale e  
del Farmaco Veterinario

ISS  
Dipartimento di Sanità Pubblica  
Veterinaria e Sicurezza Alimentare

REGIONE DEL VENETO - GIUNTA REGIONALE DIREZIONE PREVENZIONE SICUREZZA ALIMENTARE, VETERINARIA	
Data di arrivo	
Data registraz.	21 LUG. 2017
Prot. N.	299937
Indice classificazione	Pratica / Fascicolo
E.920.02.8	

**Oggetto: E. Coli STEC: applicazione dell'art. 14 del regolamento (CE) 178/2002**

La scrivente Direzione Generale, al fine di una corretta gestione del pericolo rappresentato dalla presenza generica di E. coli verocitotossico (STEC) e dei suoi particolari sierotipi negli alimenti e di dare indicazioni immediate alle Autorità competenti per valutare correttamente i referti analitici dei campionamenti ufficiali per E. coli STEC, ha richiesto all'Istituto Superiore di Sanità, già laboratorio di riferimento europeo per E. coli, compresi i STEC, di effettuare la valutazione del rischio e di valutare la bozza delle linee guida "Draft guidance document on the application of article 14 of regulation (ec) n°178/2002 as regards food contaminated with shiga toxin-producing escherichia coli (stec)" discusse da tempo in sede di Commissione Europea ma non ancora approvate.

Avendo preso visione della risposta dell'ISS, la scrivente Direzione Generale, in attesa di future indicazioni comunitarie, ritiene che quelle fornite dalla versione della bozza di linee guida comunitarie e dal parere dell'ISS che ad ogni buon fine si allegano, possano fornire una guida valida, da utilizzare nella gestione della problematica.

IL DIRETTORE GENERALE  
(Dott. Giuseppe Ruocco)

Responsabile dell'ufficio 2 Dott. Pietro Noè  
Referente: Daniele Nalin uff. 2 DGISAN email: d.nalin@sanita.it  
Giuseppe Lediani uff. 2 DGISAN e-mail: g.lediani@sanita.it

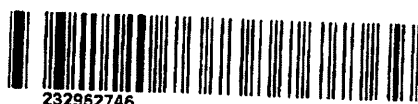


Prot. ISS 13630/DSAV01.10

Risposta al foglio 18202-P

del 03/05/2017

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



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 sierotipi 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 colturale 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. E' 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 morbose, 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)



EUROPEAN COMMISSION  
HEALTH AND CONSUMERS DIRECTORATE-GENERAL

Brussels,

EN

**WORKING DOCUMENT**

**DRAFT**

**GUIDANCE DOCUMENT ON THE APPLICATION OF ARTICLE 14 OF  
REGULATION (EC) N°178/2002 AS REGARDS FOOD CONTAMINATED WITH  
SHIGA TOXIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI (STEC)**

*This document has been established for information purposes only. It has not been adopted or in any way approved by the European Commission.*

*The European Commission does not guarantee the accuracy of the information provided, nor does it accept responsibility for any use made thereof. Users should therefore take all necessary precautions before using this information, which they use entirely at their own risk.*

## **PURPOSE OF THIS DOCUMENT**

This document is directed at competent authorities of Member States and aims to assist them when they are confronted with food with positive STEC results by providing them with guidance for a harmonised application of Article 14 of Regulation (EC) No 178/2002. This document does not intend to provide guidance on how STEC surveillance or monitoring should be conducted by Member States or food business operators.

## **NOTE**

This document is an evolving document and may be updated as necessary to take account of new scientific data, experiences and information from competent authorities and from the Commission's Health and Consumers Directorate General.

*The Court of Justice of the European Union constitutes the judicial authority of the EU and is the institution which interprets European Union law as last resort.*

### ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS USED IN THE GUIDANCE DOCUMENT

CA	Competent authorities
EFSA	European Food Safety Authority
EURL	European Union Reference Laboratory
FBO	Food Business Operators
MS	Member State
RTE	Ready-to-eat
STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>
VTEC	Verocytotoxin-producing <i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
<i>stx</i> gene	Shiga toxin-coding gene
<i>eae</i> gene	Intimin-coding gene
<i>aaiC</i> and <i>aggR</i> genes	Genetic markers characteristic for EAEC

## TABLE OF CONTENTS

1. BACKGROUND AND OBJECTIVES.....	5
2. GENERAL RECOMMENDATIONS FOR A HARMONIZED APPLICATION OF ARTICLE 14 OF REGULATION (EC) NO 178/2002 .....	6
3. STEC HAZARD CHARACTERIZATION .....	6
4. RECOMMENDATIONS FOR EXPOSURE ASSESSMENT .....	6
5. RECOMMENDATIONS FOR RISK MANAGEMENT MEASURES .....	7

## 1. BACKGROUND AND OBJECTIVES

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), also known as verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC), are one of the most common causes of gastrointestinal illness around the world. These food-borne pathogenic bacteria are frequently associated with severe forms of infection including hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. As reported by the last edition of the European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks<sup>1</sup>, *E. coli* O157 is the STEC serotype most often implicated in outbreaks although there are numerous other STEC serotypes that have caused serious human illness and outbreaks. These outbreaks are frequently associated with the consumption of fresh products, along with ready-to-eat (RTE) food.

The last major STEC outbreak occurred in 2011 from sprouts and, since then, most Member States (MS) have significantly increased the number of official controls aiming at detecting the presence of STEC in food placed on their market. These controls concern both imported and domestically produced foodstuffs.

The complexity of STEC relates to the difficulty of designating individual serotypes as pathogens. The plasticity of the genome, resulting in the acquisition of virulence or adherence properties from other organisms, normally by means of translocation on phages, means that new and unexpected strains are likely to appear in an unpredictable way over time. The major 2011 outbreak of *E. coli* O104:H4 is an example of the genomic variability referred to above and has seriously challenged the concept of STEC seropathogenicity, in particular the seropathotype approach proposed by Karmali and colleagues in 2003 (Karmali et al., 2003).

In April 2013, the European food safety authority (EFSA) published a scientific opinion<sup>2</sup> on "VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment". This opinion acknowledges that, even if it is still not possible to fully define human pathogenic STEC or identify factors for STEC that absolutely predict the potential to cause human disease, a molecular classification may give a first common approach which could assist the Competent Authorities (CA) of MS in conducting a risk assessment according to Article 14 of Regulation (EC) No 178/2002 when confronted with positive STEC results and in taking the appropriate measures to ensure that the risk for consumers is reduced as much as possible.

As no specific STEC food safety criteria have been laid down in Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria of foodstuffs<sup>3</sup> (except for sprouts), the task of MS when managing STEC positive results can be challenging. It has to be noted that the application of the general principles of food hygiene at all steps of the food production chain is the main strategy for Food Business Operators (FBO) to prevent the food contamination by STEC.

---

<sup>1</sup> <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3547.pdf>

<sup>2</sup> <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/3138.pdf>

<sup>3</sup> OJ L 338, 22.12.2005, P. 1

The purpose of the present document is to assist MS confronted with food with positive STEC results by providing them with guidance for a harmonised application of Article 14 of Regulation (EC) No 178/2002.

This document does not intend to provide guidance on how STEC surveillance or monitoring should be conducted by MS or FBO, nor has the ambition to recommend a sampling strategy for STEC in food.

The approach proposed in this document is applicable to all food commodities.

## **2. GENERAL RECOMMENDATIONS FOR A HARMONIZED APPLICATION OF ARTICLE 14 OF REGULATION (EC) NO 178/2002**

Article 14 of Regulation (EC) No 178/2002 prohibits food being placed on the market if it is unsafe. Food is deemed to be unsafe if it is considered to be injurious to health or unfit for human consumption. Once a hazard is identified in food which might make it injurious to health, an assessment of the associated risk should be carried out, taking into account the potential exposure of consumers to this hazard. This exposure assessment should consider the normal conditions of use of the food, such as cooking, and the particular health sensitivities of specific categories of consumers where food is intended for that category of consumers.

Therefore, when confronted with food where a potential hazard has been detected, CA should always consider how serious the risk is before imposing any corrective measures. For this purpose, two key questions should be addressed:

- what harm might the contaminated food cause if directly ingested by consumers?
- how likely is it considering the intended use of this food?

## **3. STEC HAZARD CHARACTERIZATION**

So far, according to the 2013 EFSA opinion, no single or combination of marker(s) has been found to define pathogenic STEC. Therefore, it is not possible to fully define human pathogenic STEC or to identify factors for STEC that absolutely predict the potential to cause human disease.

As scientific uncertainty in defining STEC pathogenicity persists, it seems prudent to consider the presence of the *stx* gene in an isolated *E. coli* strain ("presence of STEC") as a hazard entailing a high risk of causing a serious human disease if the contaminated food is directly ingested by consumers.

## **4. RECOMMENDATIONS FOR EXPOSURE ASSESSMENT**

As different types of food are associated with different levels of risk for humans to become infected by STEC, MS should include information on the final destination or intended use of the food in the exposure part of their risk assessment.

For this purpose, when the laboratory results have confirmed the presence of the hazard (i.e. presence in an isolated *E. coli* strain of the *stx* gene), the contaminated food may be

classified, for the ease of convenience, according to two risk profiles: food profile 1 and food profile 2.

Food profile 1 should include contaminated RTE (food category "a") or non-RTE food frequently or usually consumed without a sufficient treatment able to eliminate or reduce to an acceptable level the risk of infection by STEC (food category "b"). In order to help classify food in this latter category, MS should take into account domestic consumption habits on their territory (e.g. minced beef steak is often consumed undercooked or even rare in certain MS). Food profile 1 should be considered as the riskiest food as regards the possibility of human infection.

Food profile 2 should include only contaminated food very likely to be consumed with the appropriate treatment able to eliminate or reduce to an acceptable level the risk of infection by STEC (e.g. food intended to be thoroughly cooked before consumption) and for which clear information is provided to the consumers, including information on the label, and possible other information generally available to consumers concerning the avoidance of specific adverse health effects from a particular food or category of foods (food category "c").

Under certain circumstances, MS may be confronted with contaminated food which is not yet at retail level and has different intended end uses (e.g. imported beef carcasses). In this case, MS cannot easily classify it in one of the two risk profiles and MS should base their classification decision on the FBO's ability to demonstrate, to the satisfaction of the CA, that the concerned product will be correctly labelled to inform successive FBOs and final consumers that a thorough cooking is needed before consumption. If this FBO's capacity cannot be demonstrated, the concerned food should be considered as a food with a risk profile 1 following a precautionary approach principle.

## 5. RECOMMENDATIONS FOR RISK-MANAGEMENT MEASURES

Risk management measures should only be decided when the entire set of analytical results is available to confirm the hazard, i.e. the presence in an isolated *E. coli* strain of the *stx* gene.

For food with a risk profile 1, which should be considered as the riskiest food as regards the possibility of human infection, corrective actions, aiming at eliminating or reducing to an acceptable level the risk of infection by STEC, should be triggered as soon as the hazard has been confirmed.

Whereas for food with a risk profile 2, only STEC strains belonging to the serogroups most frequently associated with severe illnesses (i.e. serogroups O157, O26, O103, O145, O111, O104) should trigger corrective actions because of the risk of subsequent cross-contamination with RTE foods at retail or at consumer's kitchen level.

Corrective actions should differ depending on whether the contaminated food has already reached retail level or not:

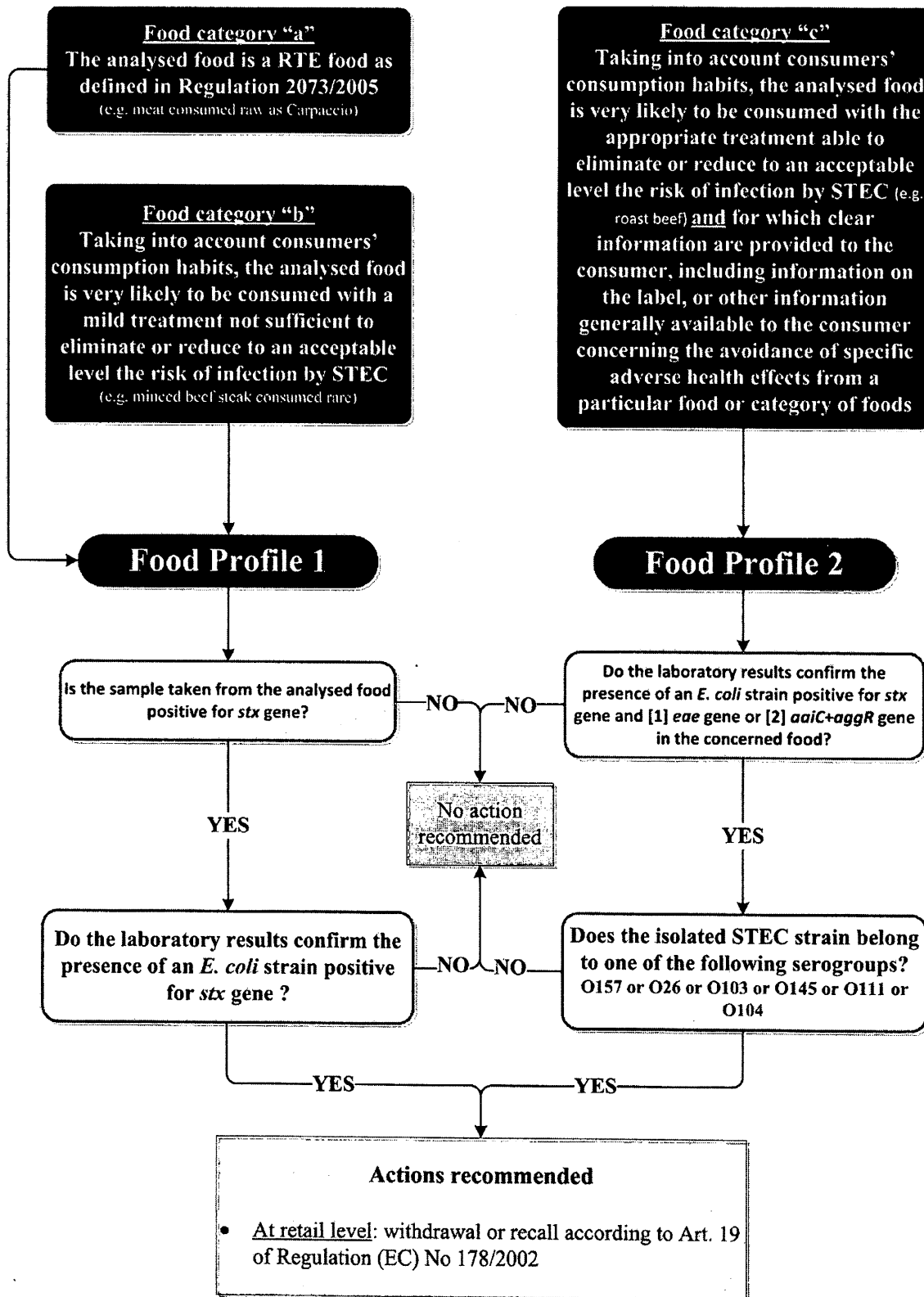
- Food already at retail level should be withdraw or recall according to Article 19 of Regulation (EC) No 178/2002;
- Food not yet at retail level may be submitted to further processing by a treatment eliminating the STEC hazard.

\*\*\*

The flowcharts 1 and 2 summarise the recommendations described in this guidance document.

DRAFT

**Flowchart 1:** recommendations for a harmonized application of Article 14 of Regulation (EC) No 178/2002 as regards analysed foodstuffs contaminated by Shiga toxin producing *E. coli* sampled at retail level.



**Flowchart 2:** recommendations for a harmonized application of Article 14 of Regulation (EC) No 178/2002 as regards analysed foodstuffs contaminated by Shiga toxin producing *E. coli* sampled along the food chain (except at retail level).

