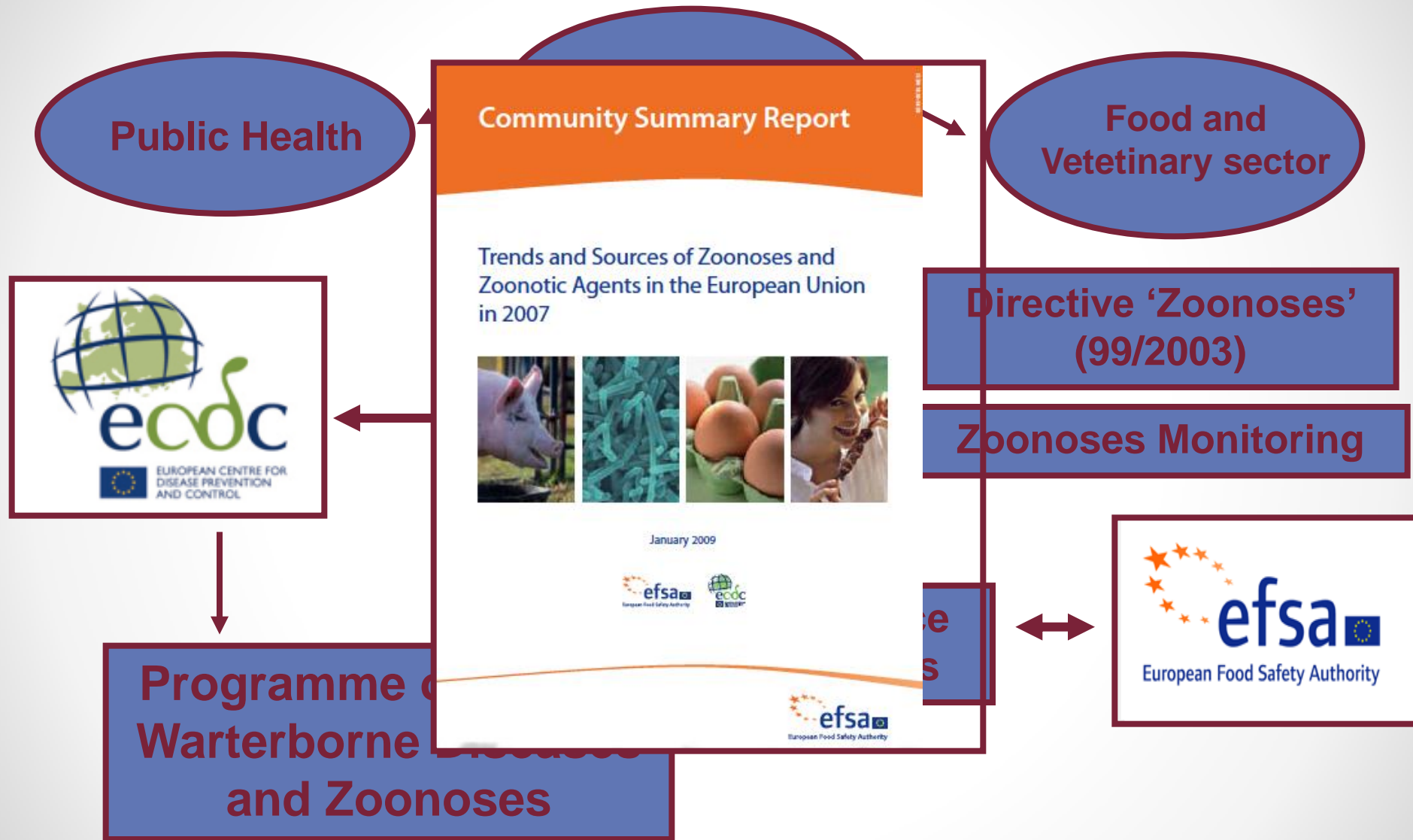


Focolaio di listeriosi negli USA da ricotta salata prodotta in Italia

*Istituto Superiore di Sanità
Luca Busani*

*IZS Abruzzo e Molise «G Caporale»
Laboratorio Nazionale di Riferimento per Listeria
monocytogenes
Vicedalia Acciari - Luigi Iannetti*

Sorveglianza delle MTA in EU



Il sistema EPIS - Epidemic Intelligence Information System:

Una nuova prospettiva di approccio informativo alle MTA

- **Piattaforma web per favorire il rapido scambio di informazioni su situazioni a potenziale rischio epidemico, di rilevanza internazionale**
 - ✓ Epidemiologi, microbiologi, biologi molecolari
 - ✓ Network 27 Paesi EU + 8 extra EU (USA, Canada, Turchia, Australia, Giappone, R. Sud Africana, Svizzera)
- Favorire il networking tra i Paesi e l'integrazione multidisciplinare
- Favorire la raccolta di informazioni per valutare il rischio di diffusione dei focolai epidemici (Rapid Risk Assessment)
- **Sistema flessibile e tempestivo che consente di superare alcune criticità dei flussi di sorveglianza tradizionale per MTA**

EPIS – Urgent Inquiry

Date	EPIS Urgent Inquiry	N.cases	Country	Reply - Italy
26/10/2012	Outbreak of listeriosis in France, sept-oct 2012	21	France	
13/09/2012	Listeriosis outbreak in Finland	6	Finland	no cases
09/08/2012	Outbreak of listeriosis in the U.S. possibly associated with imported cheese	8	USA	1
30/01/2012	Emergence of a strain of <i>Listeria monocytogenes</i> with new PFGE profiles	13	France	
05/04/2011	outbreak <i>Listeria</i> 1/2a in Belgium	16	Belgium	
19/11/2010	Listeriosis in German patients and a fish product	11	Germany	no cases
06/04/2010	UI on behalf of Finland - <i>Listeria monocytogenes</i> serotype 1/2	22	Finland	

Le indicazioni in EPIS (9 Agosto)

- I casi erano da 9 Stati (CA, DC, MD, MN, NJ, NM, NYC, OH, PA)
- Gli isolati erano **sierotipo 1/2a** con **2 PFGE pattern combination**:
 - 8 isolati PFGE pattern combination 1 (non comune in *PulseNet*)
 - 1 isolato PFGE pattern combination 2 (mai riportato in *PulseNet*)
- Sospetta fonte: formaggio **importato** o Americano
- La richiesta inviata via EPIS era: **informazioni su qualsiasi caso di listeriosi del 2012 con un PFGE pattern indistinguibile dai pattern del focolaio**

Risposte:

- **Italia**

- Un ceppo di *Listeria monocytogenes* con PFGE pattern (Ascl) simile a quello del focolaio in USA era stato isolato nel Novembre 2011 da una donna di 83 anni deceduta il 12/01/2012.
- Indagine epidemiologica sul caso ha riportato consumo frequente di formaggio francese di pecora/capra acquistato da un rivenditore a Martigue (France).
- Postata in EPIS il 28/08/2012

- **Francia**

- Due casi nel 2012 (gennaio e marzo) compatibili con il pattern 1 del focolaio USA
- Un caso aveva soggiornato a Milano prima di manifestare I sintomi
- Sospetto consumo per entrambi i casi di formaggio 'emmental'

- **Danimarca, Grecia, Slovenia e Svezia**

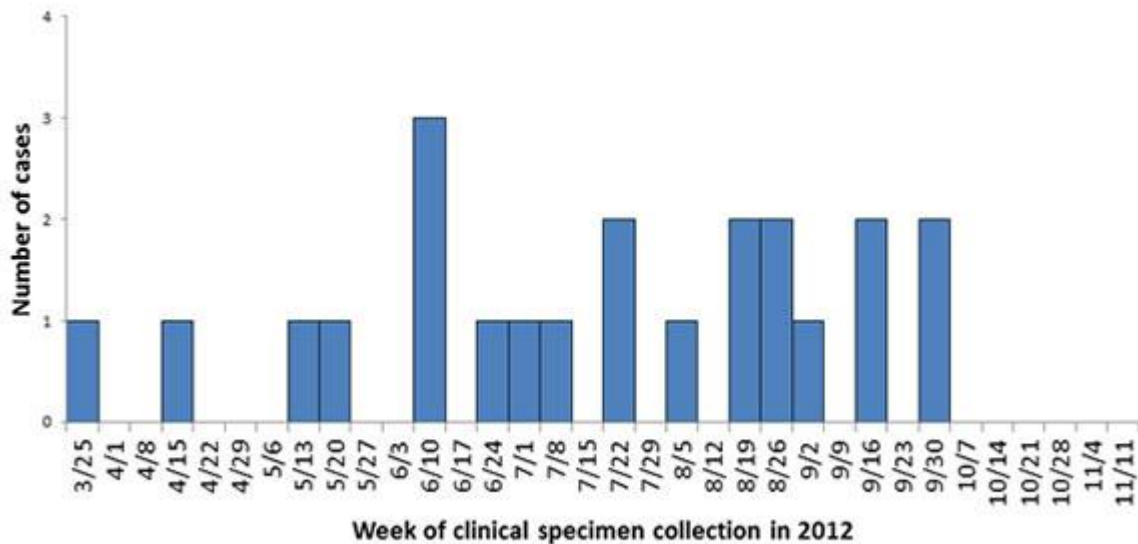
- Nessun caso

IL focolaio di Listeriosi in USA



Casi: 22
Stati Coinvolti: 14
Decessi: 4
Ospedalizzati: 20
Richiamo: SI

10 Settembre 2012 → richiamo volontario del formaggio sospetto in USA



Azioni a livello Nazionale

- 12/9/2012 attraverso il sistema **INFOSAN** il Ministero della Salute Italiano è stato ufficialmente informato del focolaio di Listeriosi connesso ad un formaggio Italiano
- Lo stesso giorno il **Contact Point Italiano per il *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*** ha inoltrato l'informativa alle ASL in tutto il Paese
- Il 17/09 è stato organizzato un Team di investigazione con:
 - Istituto Superiore di Sanità
 - IZS Abruzzo e Molise
 - Carabinieri NAS
 - Servizi veterinari di Puglia e Basilicata

Ricerca dei casi in Italia

Fonti di dati:

Sistema di sorveglianza delle malattie infettive (SIMI):

- Aumento dei casi: fino al 2006: 38 casi/anno (0.06 casi per 100 000)
- Dal 2007-2010: 105 casi/anno (0.2 casi per 100 000)
- Soprattutto pazienti <65
- Nessuna informazione sugli isolati

Sorveglianza di Laboratorio Enternet:

- 420 isolati dal 2000 al 2012
- Sierotipo 1/2a in aumento +47% dal 2000 al 20110
- Sierotipo 4b in diminuzione -31% nello stesso periodo

Ricerca della fonte in Italia



La Ricotta Frescolina negli USA era arrivata partendo da uno stabilimento in (A) in Puglia che produceva il formaggio partendo da prodotto semilavorato ricevuto da altri stabilimenti in Sardegna (B,C,D)

Le ispezioni negli impianti hanno rilevato numerose irregolarità igienico sanitarie, strutturali e procedurali

Allerta RASFF 2012.1395 il 3/10

Richiamo internazionale dei formaggi prodotti nell'impianto A lo stesso giorno

Risultato campionamenti negli impianti implicati

- Campioni di formaggi vari (esclusa ricotta Frescolina)

Ascl - Apal	PFGE Ascl	PFGE Apal	ID ceppo	N° verbale	Matrice	Lotto	Sede prelievo	Produttore	Data prelievo	N° ceppi	Sier.	Pulsotipo Ascl	Pulsotipo Apal	
Cluster 3	[PFGE Ascl]	[PFGE Apal]	7634	122	Formaggio semistagionato Frescolina	022030	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0408	GX6A12.0096 FDA	
			8359	89	Ricotta Torretta	04/03/13	Ingress Levante s.p.a	non indicato	2012-10-09	3	1/2 a	GX6A16.0408	GX6A12.0096 FDA	
			Sample B										GX6A16.0408	GX6A12.0096 FDA
Cluster 1	[PFGE Ascl]	[PFGE Apal]	Sample A									GX6A16.0068	GX6A12.0368 FDA	
			Sample C										GX6A16.0268	GX6A12.2297 FDA
			8130	5/80	Ricotta Toscana a spicchi nuda	130712	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Caseificio Spadi Enzo	2012-10-03	1	1/2 a	GX6A16.0064	GX6A12.0053	
Cluster 2	[PFGE Ascl]	[PFGE Apal]	7675	106	Formaggio semistagionato	162B06 / 342E28	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Soc. Coop. "S. Pasquale" / La Concordia s.r.l.	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0068	GX6A12.0042	
			7675	106	Formaggio semistagionato	162B06 / 342E28	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Soc. Coop. "S. Pasquale" / La Concordia s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0068	GX6A12.0075	
			7669	101	Formaggio semistagionato	162G04	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			7671	103	Formaggio semistagionato	162E17	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			7673	105	Formaggio semistagionato	162H09	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			7679	107	Formaggio semistagionato	162B08	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			7680	110	Formaggio semistagionato	162D13 / 162D26	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			7683	112	Formaggio semistagionato	022G19	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			7687	114	Formaggio semistagionato	162E30	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0076	
			Ceppo RPA11 ISS		Ricotta Frescolina Arositta	012F06	Fattorie Chiarappa s.r.l.	non indicato	2012-08-19		1/2 a			
			7696	124	Formaggio semistagionato Frescolina	022G05	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	3	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7703	133	Formaggio semistagionato Ricotta Dura	162B22	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	5	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7699	128	Formaggio semistagionato Frescolina Arrostita	450304	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Coop. Soc. Agricola Allevatori di Mores	2012-09-21	5	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7668	100	Formaggio semistagionato	162B08	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	5	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7669	101	Formaggio semistagionato	162G04	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7671	103	Formaggio semistagionato	162E17	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7672	104	Formaggio semistagionato	162F06	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7673	105	Formaggio semistagionato	162H09	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7679	107	Formaggio semistagionato	162B08	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	3	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7680	110	Formaggio semistagionato	162D13 / 162D26	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7681	111	Formaggio semistagionato	022H9	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7683	112	Formaggio semistagionato	022G19	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	4	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7684	113	Formaggio semistagionato	022G24	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7687	114	Formaggio semistagionato	162E30	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	4	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7688	115	Formaggio semistagionato	162F20	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	5	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7689	116	Formaggio semistagionato Frescolina	022F20	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	3	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7695	123	Formaggio semistagionato Frescolina	022F13	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	5	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7701	131	Formaggio semistagionato Frescolina	05/03/13	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7704	134	Formaggio semistagionato Torretta	109M09	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			8343	85	Ricotta Marzotica	200113	Ingress Levante s.p.a	non indicato	2012-10-09	1	1/2 a	GX6A16.0036	GX6A12.0070	
			7701	131	Formaggio semistagionato Frescolina	05/03/13	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0107	GX6A12.0071	
			7652	99	Formaggio semistagionato	342A19	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. La Concordia s.r.l.	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7671	103	Formaggio semistagionato	162E17	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7672	104	Formaggio semistagionato	162F06	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7673	105	Formaggio semistagionato	162H09	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7679	107	Formaggio semistagionato	162B08	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7680	110	Formaggio semistagionato	162D13 / 162D26	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7684	113	Formaggio semistagionato	022G24	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	3	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7689	116	Formaggio semistagionato Frescolina	022F20	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7691	118	Formaggio semistagionato Frescolina	022F06	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	3	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7700	130	Formaggio semistagionato Ricotta Marzotica	130213	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			7701	131	Formaggio semistagionato Frescolina	05/03/13	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-09-21	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			8105	8/71	Ricotta Torretta Marte	082F06	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. Pastori Oschiresi	2012-10-03	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			8126	8/78	Ricotta Frescolina Arositta	012222	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Coop. Soc. Agricola Allevatori di Mores	2012-10-03	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			8129	8/79	Ricotta Marzotica Marte Toscanella	130413	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Coop. Soc. Agricola Allevatori di Mores	2012-10-03	4	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			8342	84	Ricotta Marzotica	140113	Ingress Levante s.p.a	Latteria Soc. Coop. "S. Pasquale" s.r.l.	2012-10-09	2	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0072	
			Ceppo A ISS		Tampone su tombino di scolo		Soc. Coop. "S. Pasquale"		2012-10-04		4 b			
			8129	8/79	Ricotta Marzotica Marte Toscanella	130413	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Coop. Soc. Agricola Allevatori di Mores	2012-10-03	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0073	
			7681	111	Formaggio semistagionato	022H9	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0074	
			7684	113	Formaggio semistagionato	022G24	Fattorie Chiarappa s.r.l.	Latteria Soc. Coop. di Pozzomaggiore	2012-09-21	1	4 b	GX6A16.0010	GX6A12.0074	
			Ceppo P ISS		Tampone spazzola macchina lava-formaggi		Soc. Coop. di Pozzomaggiore		2012-10-03		4 b			
			Sample D									GX6A16.1618	GX6A12.2384 FDA	

Gestione della comunicazione

- 9/8/12: EPIS alert
- 10/8/12 → allerta al network EnterNet in seguito all'EPIS UI
- 12/9/12: allerta INFOSAN all'Italia
- 12/9/12 → informative su INFOSAN e RASFF inviate alle regioni
- 13 e 15/9/2012 → lista dei formaggi distribuiti dall'impianto A inviata a INFOSAN (*tracing forward*)
 - Richiamo internazionale dei prodotti
 - RASFF2012.1395. il 3/10/2012 con lista di distribuzione dei prodotti dall'Azienda A
- Conference call con FDA/CDC 28/9/2013 e 5/11/2013

- In US dopo il richiamo dei formaggi nessun altro caso
- Dopo l'allerta INFOSAN l'indagine epidemiologica ha prevenuto l'ulteriore vendita di formaggio dall'impianto A
- **Punti rilevanti:**
 - Pulse-net in US ha consentito di identificare un outbreak multistato
 - Efficace **Tracing-back** nonostante la catena di produzione lunga e complessa
 - La **Rapida diffusione di informazioni attraverso i sistemi di allerta (EPIS, INFOSAN, RASFF ufficiali e non)** ha semplificato i lavori
- **Criticità:**
 - **Migliorare la sorveglianza** (ricerca dei casi lenta e poco efficace)
 - **Migliorare il tracing-forward** dei prodotti (problemi di tracciabilità dei prodotti con ritardi nel RASFF)
 - **Rinforzare i controlli** negli stabilimenti e lungo la catena di produzione ai sensi della normativa (Reg. CE 852/04 – 853/04 – 854/04 – 882/04)

Il caso ricotta salata: attività maggio 2013

A maggio 2013 tecnici del LNR per *Listeria monocytogenes* e del Ministero della Salute hanno effettuato nuovi tamponi ambientali e prelievi di prodotto presso la ditta esportatrice e presso le ditte produttrici della materia prima (ricotta semistagionata) con l'obiettivo di valutare:

- il grado di contaminazione da *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* negli stabilimenti epidemiologicamente correlati ai casi di listeriosi umana riscontrati negli Stati Uniti d'America (USA) nel 2012
- la presenza di eventuali ceppi di *Listeria monocytogenes* correlabili al ceppo epidemico
- la presenza di ceppi di *Listeria monocytogenes* persistenti



Il caso ricotta salata: attività maggio 2013

- Sono stati sottoposti a campionamento lo stabilimento esportatore A (Puglia), e i 5 stabilimenti localizzati in Sardegna produttori dei semilavorati e/o dei prodotti finiti da confezionare
- Oltre agli stabilimenti già esaminati nel corso della fase di emergenza (stabilimenti A, B, C e D), sono stati sottoposti a campionamento altri due stabilimenti fornitori di semilavorato (stabilimenti E ed F)
- Tutti i campioni sono stati prelevati nei giorni 6 e 7 maggio 2013



Il caso ricotta salata: attività maggio 2013

- In tutti gli stabilimenti sono stati effettuati tamponi ambientali con spugnette (sponge bag), in corrispondenza delle diverse fasi di lavorazione:
 - caseificazione
 - lavorazione ricotta (quando presente)
 - salatura
 - stagionatura e operazioni correlate (oliatura, plastificazione)
 - stoccaggio
 - taglio/confezionamento
- le superfici sono state suddivise in “a contatto” (SC) e “non a contatto” (NC)
- In ciascun stabilimento è stata prelevata ricotta salata se disponibile, o in alternativa un altro prodotto simile (stagionato)

Il caso ricotta salata: attività maggio 2013

- Complessivamente sono stati prelevati:
 - 179 tamponi ambientali
 - 25 campioni di ricotta salata
 - 10 campioni di pecorino DOP
- I prodotti sono stati analizzati per ricerca e numerazione di *Listeria monocytogenes* mediante le metodiche ISO 11290-1:1996 Amd04-1 e 2
- I tamponi ambientali sono stati analizzati mediante la metodica USDA/FSIS MLG 8.09



Il caso ricotta salata: attività maggio 2013. Risultati

- Tutte le analisi effettuate sui prodotti hanno dato esito negativo
- I tamponi ambientali prelevati negli stabilimenti B e C sono risultati tutti negativi
- Si riporta una tabella riassuntiva dei risultati negli stabilim. A, D, E e F:

Stabilimento	<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Listeria spp.</i>		
	NC	SC	Tot.	NC	SC	Tot.
A	0/17	0/10	0/27	1/17 (5,9%)	0/10	1/27 (3,7%)
D	1/16 (6,2%)	1/14 (7,1%)	2/30 (6,7%)	1/16 (6,2%)	1/14 (7,1%)	2/30 (6,7%)
E	3/20 (15%)	1/9 (11,1%)	4/29 (13,8%)	5/20 (25%)	1/9 (11,1%)	6/29 (20,7%)
F	0/21	0/10	0/31	2/21 (9,5%)	1/10 (10%)	3/31 (9,7%)

Il caso ricotta salata: attività maggio 2013. Risultati

Superficie campionata	Tipo superficie	Area prelievo	Sede prelievo	Sierotipo Lm	Identificazione microbiologica (n. ceppi isolati)
Suola scarpa operatore	NC	Plastificazione formaggi	A	■	<i>L. innocua</i> (2)
Coltello	NC	Caseificio	D	1/2a	<i>L. monocytogenes</i> (3)
Macchina porzionatrice	SC	Taglio/Confezionamento	D	4b	<i>L. monocytogenes</i> (3)
Tavolo spersorio	SC	Caseificio	E	1/2a	<i>L. monocytogenes</i> (3)
Pavimento area stufatura	NC	Caseificio	E	1/2a	<i>L. monocytogenes</i> (3)
					<i>L. innocua</i> (5)
Tombino area stufatura	NC	Caseificio	E	1/2a	<i>L. monocytogenes</i> (3)
					<i>L. innocua</i> (5)
Carrello piano legno superficie inferiore	NC	Salatura	E	1/2a	<i>L. monocytogenes</i> (3)
Macchina salatrice	SC	Salatura	F	■	<i>L. innocua</i> (4)
Tombino corridoio	NC	Salatura	F	■	<i>L. innocua</i> (1)
Scaffale ripiano legno (parte inferiore)	NC	Stagionatura	F	■	<i>L. innocua</i> (1)

Il caso ricotta salata: attività maggio 2013. Risultati

- Nello stabilimento esportatore A e nello stabilimento F è stata isolata *Listeria innocua*
- Negli stabilimenti D ed E è stata isolata *Listeria monocytogenes* in diverse aree di lavorazione (**caseificio**: D-E; **taglio/confezionamento**: D; **salatura**: E)
- Erano coinvolte sia superfici a contatto che non a contatto.
- L'esecuzione di caratterizzazione (PFGE) avrebbe poi permesso di capire se le contaminazioni erano legate a ceppi nuovi o riportabili a persistenza dei ceppi precedentemente isolati
- La PFGE avrebbe inoltre potuto apportare nuove informazioni sull'origine delle contaminazioni alla base del focolaio USA



Il caso ricotta salata: analisi PFGE totale

Pertanto, tutti i ceppi relativi al caso ricotta salata inviati al LNRLm sono stati sottoposti ad analisi di caratterizzazione:

- Tipizzazione sierologica (metodo US/FDA)
- Elettroforesi a campi pulsati - PFGE (protocollo Pulsenet 2009 – CDC)

I profili PFGE sono stati analizzati con software Bionumerics versione 6.6 (Applied Maths, Belgio)



Il caso ricotta salata: analisi PFGE totale

In tutto sono stati analizzati 222 ceppi (due invii al LNRLm e ceppi dai tamponi ambientali di maggio 2013) :

- Primo invio: 106 ceppi provenienti dal stabilimento A e in un punto vendita all'ingrosso (IZS Puglia e Basilicata), più 3 profili PFGE ricevuti dall'Istituto Superiore di Sanità
- Secondo invio: 98 ceppi prelevati in punti vendita e nello stabilimento A (IZS Puglia e Basilicata)
- Ceppi maggio 2013: 18 ceppi provenienti dagli stabilimenti D ed E (LNRLm - IZS Abruzzo e Molise)

PRIMO INVIO: ceppi ricevuti

a) 106 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da:

- 28 campioni di ricotta prelevati nella ditta A
- 3 campioni di ricotta prelevati in una ditta alimentare di commercializzazione all'ingrosso.
- Provenienti da 6 produttori diversi.

PRODUTTORE	N° Ceppi
G	1
C	12
B	31
D	51
E	1
F	2
non indicato	5
D/E	3

b) 3 profili PFGE di *L. monocytogenes* ottenuti da:

- 1 ceppo da tampone ambientale dalla ditta D
- 1 ceppo da tampone ambientale dalla ditta B
- 1 ceppo da prodotto prelevato dalla ditta A

PRIMO INVIO: Caratterizzazione ceppi

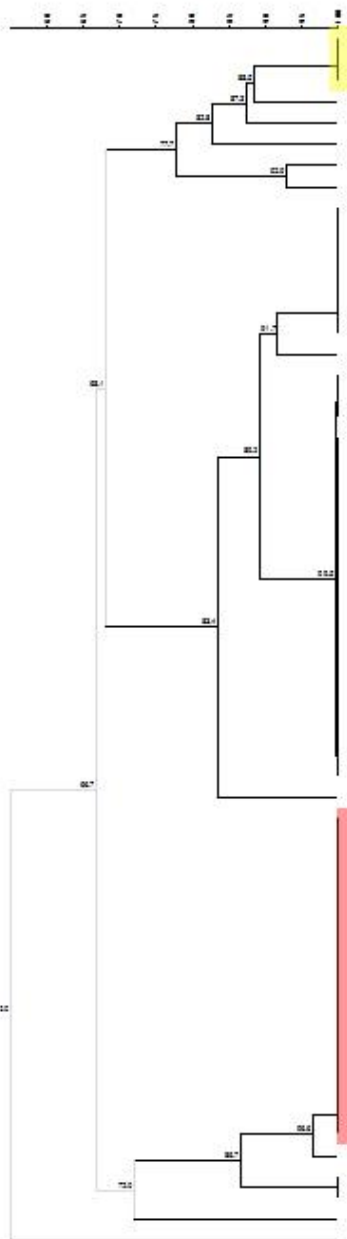
- I sierotipi di *Listeria monocytogenes* isolati sono stati l'1/2a (69,8% dei casi) e 4b (30,2% dei casi)
- Tutti i 106 ceppi sono risultati tipizzabili con gli enzimi di restrizione *Ascl* e *Apal*.
- 6 profili di macrorestrizione per l'enzima *Ascl*
- 10 profili di macrorestrizione per l'enzima *Apal*.
- L'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 10 differenti pattern
- 2 prevalenti :
 - GX6A16.0036/GX6A12.0070 (54,7%)
 - GX6A16.0010/GX6A12.0072 (26,4%)
- Il pattern GX6A16.0408 FDA/GX6A12.0096 FDA identificato come ceppo epidemico dal FDA è risultato presente nel 4,7% dei ceppi riconducibili a 2 campioni appartenenti a lotti differenti.

Asci - Apai

FFGE Asci

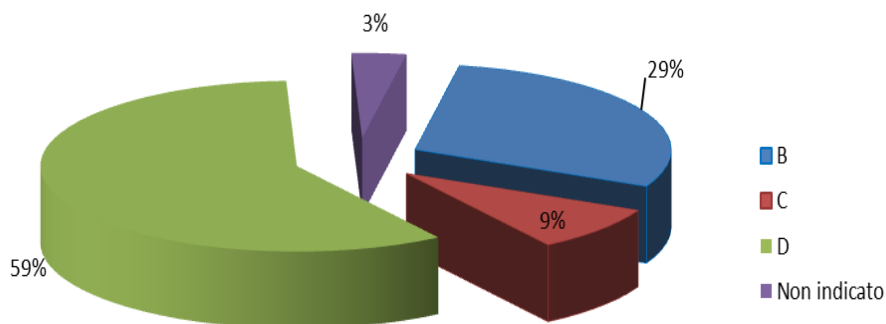
FFGE Apai

			ID CEPPO	MATRICE	PRODUTTORE	DATA PRELIEVO	N. ceppi	Pulsotipo Asc I	Pulsotipo Apa I	Sier.
			7694 E	Formaggio semis stagionato Frescolina	B	2012-09-21	2	GXSA160403 FDA	GXSA120096 FDA	1/2 a
			8358_1	Ricotta Torretta	non indicato	2012-10-09	3	GXSA160403 FDA	GXSA120096 FDA	1/2 a
			Sample B							
			Sample A					GXSA160068 FDA	GXSA120358 FDA	
			Sample C					GXSA160268 FDA	GXSA122297 FDA	
			8130 D	Ricotta Toscana e a spicchi nuda	G	2012-10-03	1	GXSA160064	GXSA120053	1/2 a
			7675 C	Formaggio semis stagionato	D_E	2012-09-21	2	GXSA160068 FDA	GXSA120042	1/2 a
			7675 E	Formaggio semis stagionato	D_E	2012-09-21	1	GXSA160068 FDA	GXSA120075	1/2 a
			7689 E	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120076	1/2 a
			7671 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120075	1/2 a
			7673 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120076	1/2 a
			7679 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120076	1/2 a
			7680 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120076	1/2 a
			7683 C	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120076	1/2 a
			7687 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120076	1/2 a
			RPA11	Ricotta Frescolina Arosita	non indicato	2012-09-19		GXSA120036		1/2 a
			7696 B	Formaggio semis stagionato Frescolina	B	2012-09-21	3	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7703 D	Formaggio semis stagionato Ricotta Dura	D	2012-09-21	5	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7699 B	Formaggio semis stagionato Frescolina Arosita	C	2012-09-21	5	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7686 A	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	5	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7689 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	2	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7671 D	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	2	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7672 A	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7673 E	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	2	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7679 A	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	3	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7680 B	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	2	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7681 C	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7683 A	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	4	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7684 D	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7687 D	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	4	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7688 C	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	5	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7689 D	Formaggio semis stagionato Frescolina	B	2012-09-21	3	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7695 A	Formaggio semis stagionato Frescolina	B	2012-09-21	5	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7701 D	Formaggio semis stagionato Frescolina	D	2012-09-21	2	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7704 C	Formaggio semis stagionato Torretta	non indicato	2012-09-21	1	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			8340	Ricotta Marzotta	non indicato	2012-10-09	1	GXSA160036	GXSA120070	1/2 a
			7701 C	Formaggio semis stagionato Frescolina	D	2012-09-21	1	GXSA160107	GXSA120071	4 b
			7692	Formaggio semis stagionato	E	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7671 A	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7672 E	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7673 A	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7679 B	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7680 A	Formaggio semis stagionato	D	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7684 B	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	3	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7689 C	Formaggio semis stagionato Frescolina	B	2012-09-21	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7691 E	Formaggio semis stagionato Frescolina	B	2012-09-21	3	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7700 D	Formaggio semis stagionato Ricotta Marzotta	B	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			7701 A	Formaggio semis stagionato Frescolina	D	2012-09-21	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			8105 C	Ricotta Torretta Mare	F	2012-10-03	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			8128 B	Ricotta Frescolina Arosita	C	2012-10-03	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			8129 B	Ricotta Marzotta Mare Toscana	C	2012-10-03	4	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			8342	Ricotta Marzotta	D	2012-10-09	2	GXSA160010	GXSA120072	4 b
			Ceppo A155	Tampone su imbuto di discolo	D	2012-10-04		GXSA160010	GXSA120072	4 b
			8129 E	Ricotta Marzotta Mare Toscana	C	2012-10-03	1	GXSA160010	GXSA120073	4 b
			7681 D	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120074	4 b
			7684 C	Formaggio semis stagionato	B	2012-09-21	1	GXSA160010	GXSA120074	4 b
			Ceppo P155	Tampone spazzola macchina lava-formaggi	B	2012-10-03		GXSA160015	GXSA120080	4 b
			Sample D					GXSA161618 FDA	GXSA122384 FDA	

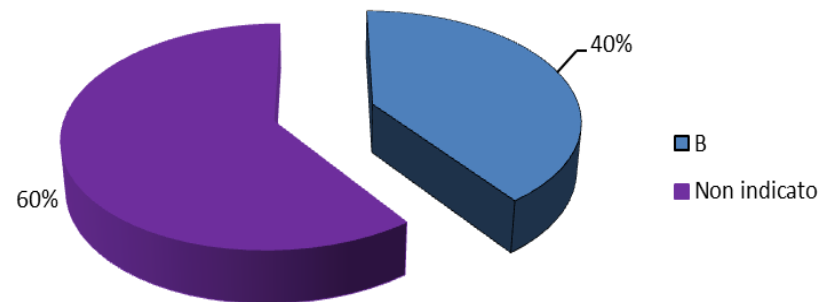


Distribuzione dei pulsotipi prevalenti

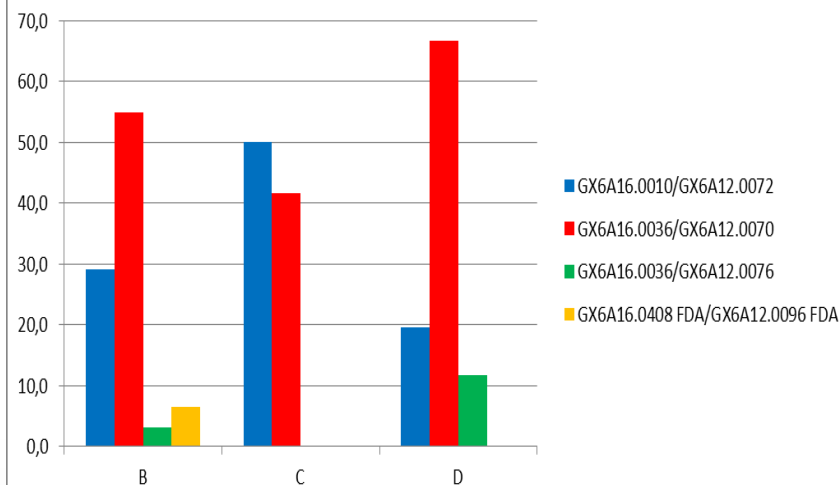
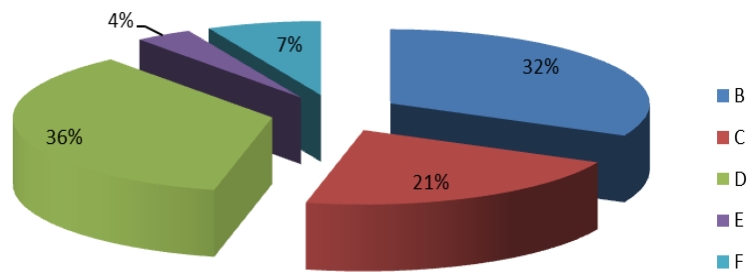
GX6A16.0036/GX6A12.0070



GX6A16.0408 FDA/GX6A12.0096 FDA



GX6A16.0010/GX6A12.0072



- 98 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da:
 - 32 campioni prelevati nello stabilimento A e in ditte alimentari di commercializzazione all'ingrosso.
 - Provenienti da 4 produttori diversi.

PRODUTTORE	N° Ceppi
C	12
D	12
E	4
F	7
non indicato	63

SECONDO INVIO: Caratterizzazione ceppi

- I sierotipi di *Listeria monocytogenes* isolati sono stati l'1/2a (86,8% dei casi) e 4b (13,2% dei casi)
- Tutti i 98 ceppi sono risultati tipizzabili con gli enzimi di restrizione *Ascl* e *Apal*.
- 5 profili di macrorestrizione per l'enzima *Ascl*
- 5 profili di macrorestrizione per l'enzima *Apal*.
- L'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 5 differenti pattern
- 3 prevalenti :
 - GX6A16.0036/GX6A12.0070 (67,3%)
 - GX6A16.0010/GX6A12.0072 (13,3%)
 - GX6A16.0408 FDA/GX6A12.0096 FDA identificato come profili del ceppo epidemico dal FDA è risultato presente nel 15,3% dei ceppi riconducibili a 8 campioni appartenenti a lotti differenti.

Asol-ApaI

PFGE AscI

PFGE ApaI

ID
CEPPO

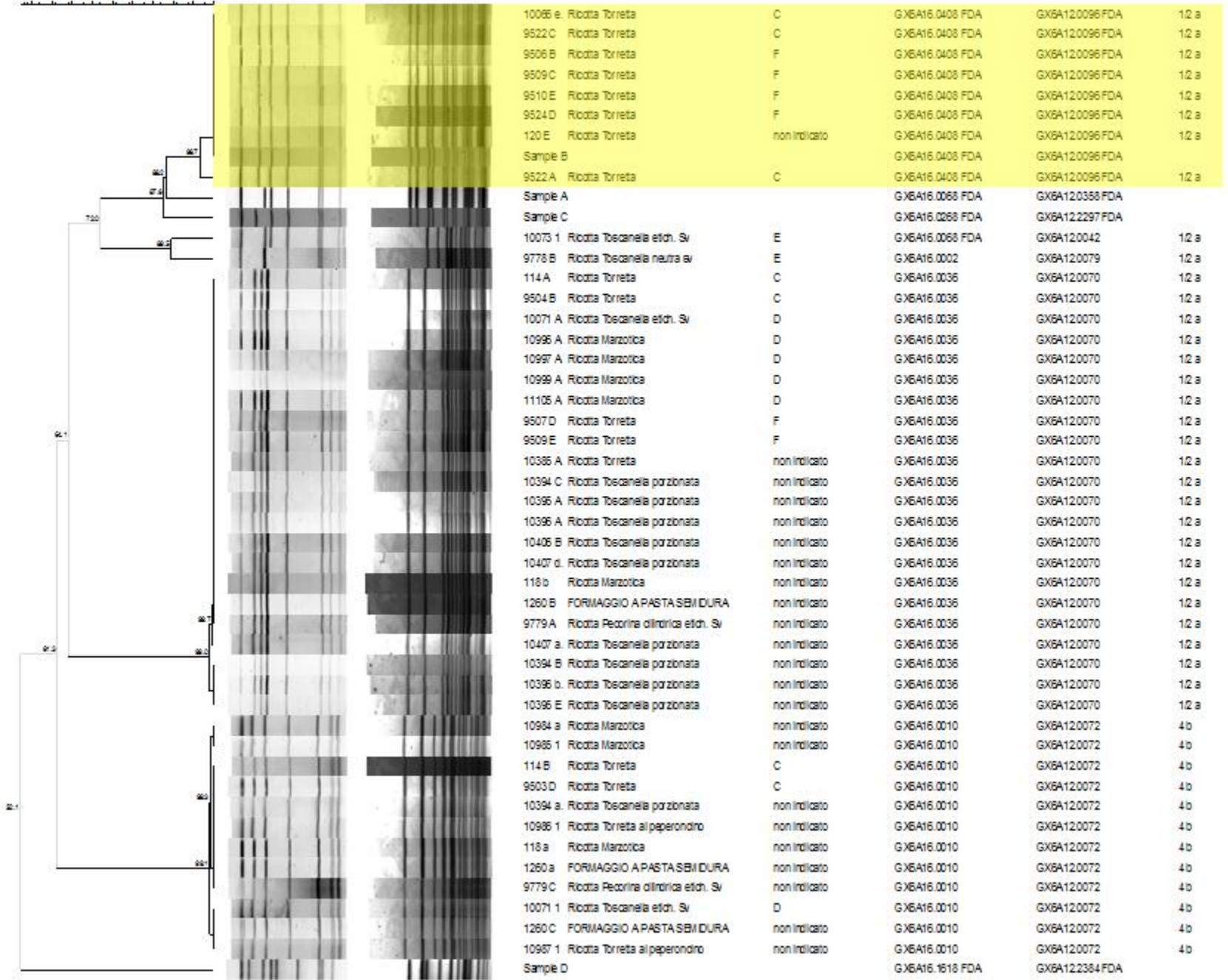
MATRICE

PRODUTTORE

PULSOTIPO
Asc I

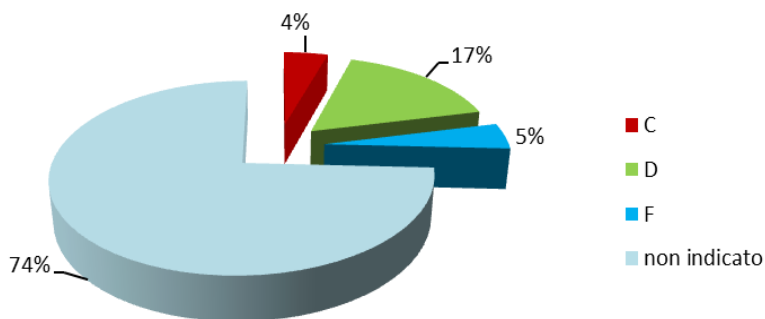
PULSOTIPO
Apa I

SIEROTIPO

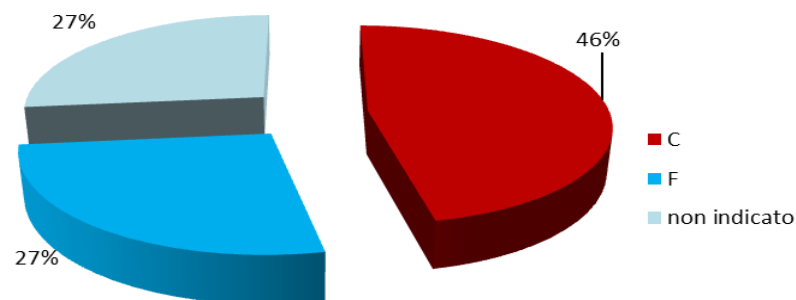


Distribuzione dei pulsotipi prevalenti

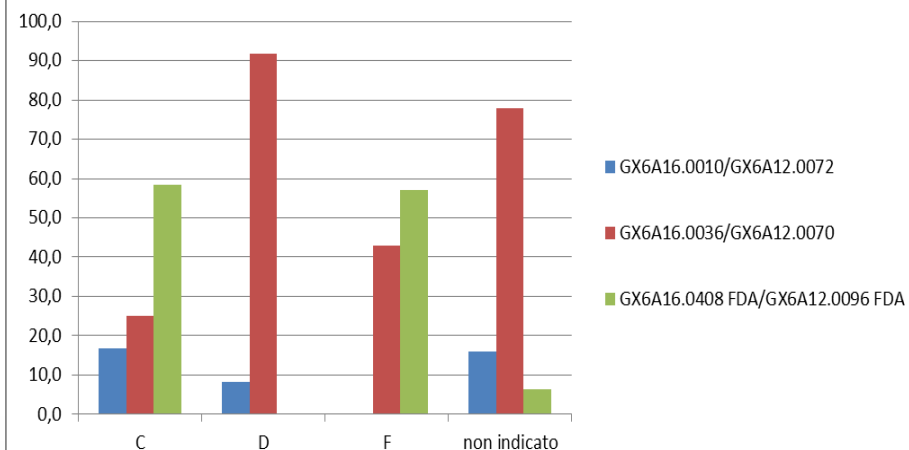
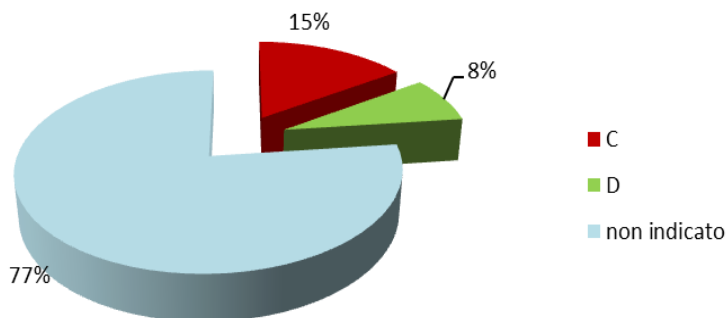
GX6A16.0036/GX6A12.0070



GX6A16.0408 FDA/GX6A12.0096 FDA



GX6A16.0010/GX6A12.0072

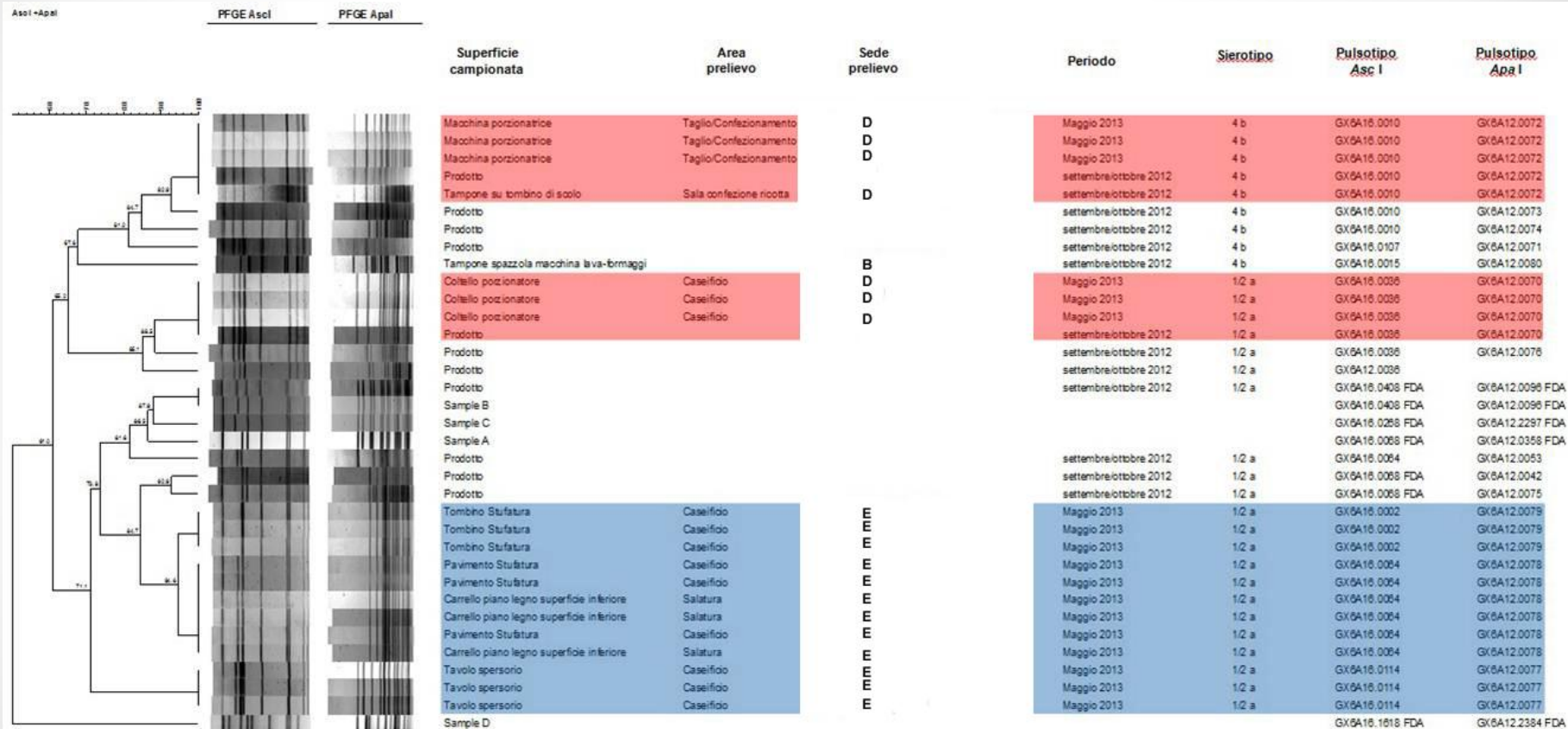


TAMPONI AMBIENTALI MAGGIO 2013: caratterizzazione ceppi (1)

- I sierotipi di *Listeria monocytogenes* isolati sono stati l'1/2a (83,3% dei casi) e 4b (16,7% dei casi)
- L'analisi **PFGE** ha permesso di ottenere 5 profili di macrorestrizione per l'enzima AscI e 5 profili di macrorestrizione per l'enzima ApaI. L'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 5 differenti pattern.
- I ceppi isolati dallo **stabilimento D** hanno mostrato una similarità pari al 100% con quelli isolati nello stesso stabilimento nel 2012 (**persistenza**), nonché isolati in prodotti finiti prelevati nel 2012 da depositi dello stabilimento esportatore A (**probabile origine delle contaminazioni**)
- Questi prodotti finiti contaminati, in diversi casi provenivano da stabilimenti diversi dallo stabilimento D, permettendo di identificare lo **stabilimento A** come **unico possibile luogo della contaminazione**

TAMPONI AMBIENTALI MAGGIO 2013: caratterizzazione ceppi (2)

- Anche i ceppi isolati nello **stabilimento E** hanno mostrato omologia con ceppi isolati nel 2012 da prodotti finiti, ma **solo se precedentemente lavorati nello stesso stabilimento E**
- **Nessuno** dei ceppi isolati a maggio 2013 ha mostrato similitudini con il ceppo clinico alla base del focolaio USA



In rosso i ceppi dalla stabilimento D, in blu dallo stabilimento E, confrontati con i ceppi clinici e ceppi da prodotti prelevati a settembre-ottobre 2012

- Le **analisi di caratterizzazione** hanno permesso di verificare la presenza di omologia tra il ceppo clinico USA e i ceppi rinvenuti in alcuni prodotti lavorati nella azienda A, confermando l'origine «italiana» del focolaio
- Le analisi di caratterizzazione, inoltre, pur non riuscendo ad identificare il ceppo clinico in alcuno degli ambienti di lavorazione esaminati, hanno permesso di chiarire le **dinamiche di contaminazione**
- In particolare, **uno degli stabilimenti fornitori (D)** è risultato essere all'**origine di contaminazioni** di prodotti finiti anche provenienti da altri fornitori, **attraverso l'ambiente dello stabilimento esportatore (A)**
- Il reperimento nel 2013 nell'ambiente di due stabilimenti (D ed E) di ceppi già isolati nel 2012 da prodotti, ha dimostrato la loro **persistenza** negli ambienti di lavorazione, indicando che **l'inadeguata applicazione di procedure di pulizia e disinfezione** sono il **punto critico** dove agire per limitare le contaminazioni da *Listeria monocytogenes*.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr. Cosimo Montagna della sezione di Putignano (BA) dell'IZS della Puglia e la Basilicata per la preziosa collaborazione.

Si ringraziano tutti i componenti del Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes* ed i volontari che hanno partecipato alle attività di prelievo ed analisi.

Grazie per
l'attenzione!

