

Casistica delle tossinfezioni causate da superfici di lavoro contaminate

Pistoia 29 – 31 Ottobre 2012



Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari



La contaminazione delle superfici



Quali sono le fonti di contaminazione di una superficie ?

- Da prodotti crudi sulla cui superficie sono naturalmente presenti batteri



Da un'indagine EFSA di alcuni anni fa risulta che in Unione Europea circa il 75% delle carcasse di pollo sono contaminate da *Campylobacter* e il 23% da *Salmonella*

Batteri	materiale	livello di contaminazione
Campylobacter	Succo di pollo, pelle, carcassa	$10^3 - 10^7$ CFU
	Contenuto cecale di polli da carne	$10^5 - 10^9$ CFU
	Superficie di fette di pollo al dettaglio	$1,9 \times 10^3$ / per fetta
E.Coli O:157 H:7	Carne macinata	5 CFU
	Feci di bovini e ovini	$10^3 - 10^5$ CFU
Salmonella	Succo di pollo, pelle, carcassa	$10^2 - 10^6$ CFU

- Dalle mani degli operatori

dopo aver usato il WC



dopo ogni contatto con attrezzature o oggetti non attinenti la manipolazione degli alimenti



dopo aver manipolato materie prime potenzialmente contaminate



carne cruda di bovino

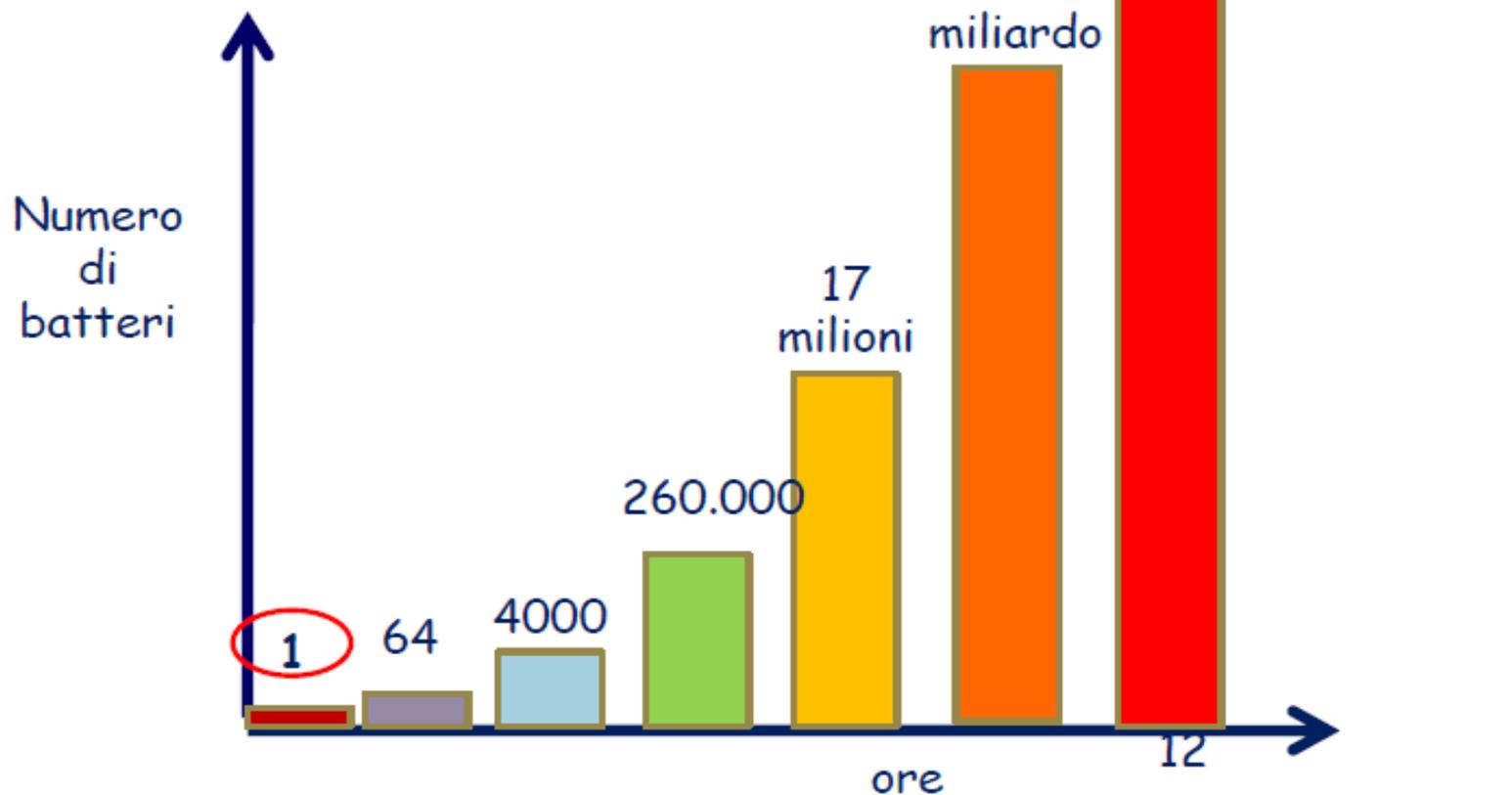


dopo essersi soffiato il naso



carne cruda di pollo

Numero di batteri presenti sulle mani degli operatori fino a 12 ore di distanza dalla contaminazione



- Dagli imballaggi



- Alcuni autori americani hanno dimostrato la presenza di *Campylobacter* nel **3 %** dei campioni nei quali è stato analizzata la pellicola esternamente e nel **34%** dei campioni in cui è stata analizzata anche internamente



- Dall'aria ambientale

- Nell 'aria sono sempre presenti microrganismi che
↑ **pulviscolo**
- Nel pulviscolo: materiale inorganico ed organico (anche batteri, virus, muffe, lieviti)
- Umidità: influenza la presenza dei microrganismi e la tipologia (es muffe)

- Dall'utilizzo di acqua non potabile per la pulizia delle superfici



Come persistono i microrganismi sulle superfici ?

Il pericolo maggiore è la formazione sulle superfici a contatto con gli alimenti di **BIOFILM**

BIOFILM = matrice biologica adesiva ad una superficie solida costituita da microrganismi e sostanze polimeriche, di solito esopolisaccaridi prodotti dai microrganismi stessi

Lo scopo della formazione di biofilm è quello di proteggere i microrganismi negli ambienti ostili e di agire come una trappola per le sostanze nutritive

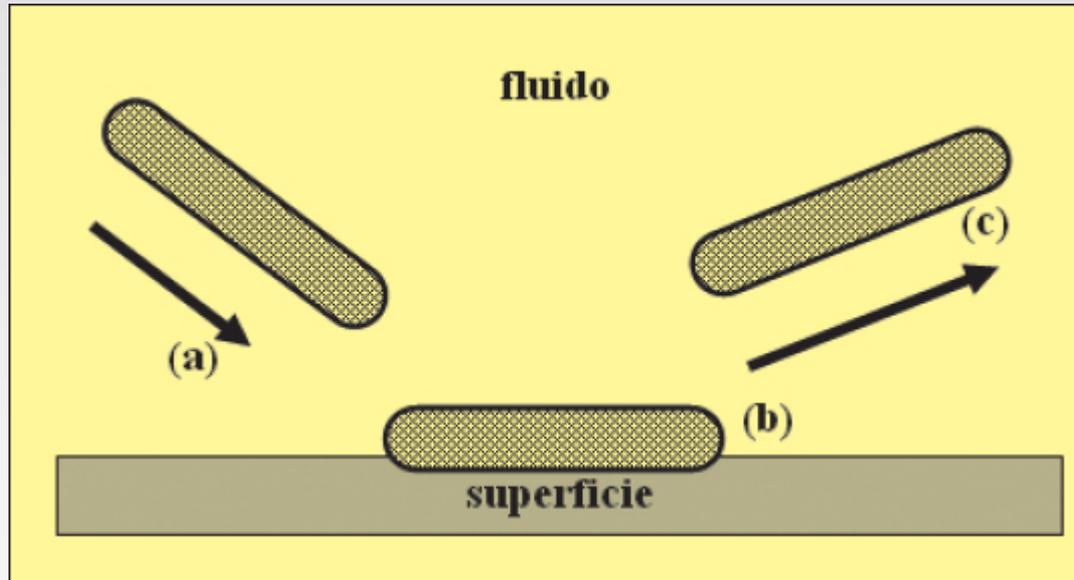
Come si forma il biofilm ?

- *Fase 1 : condizionamento della superficie*

I batteri, insieme a molecole organiche e inorganiche, come per esempio proteine derivanti dalla lavorazione di latte e carne, si adsorbono sulla superficie formando il **FILM CONDIZIONANTE**.

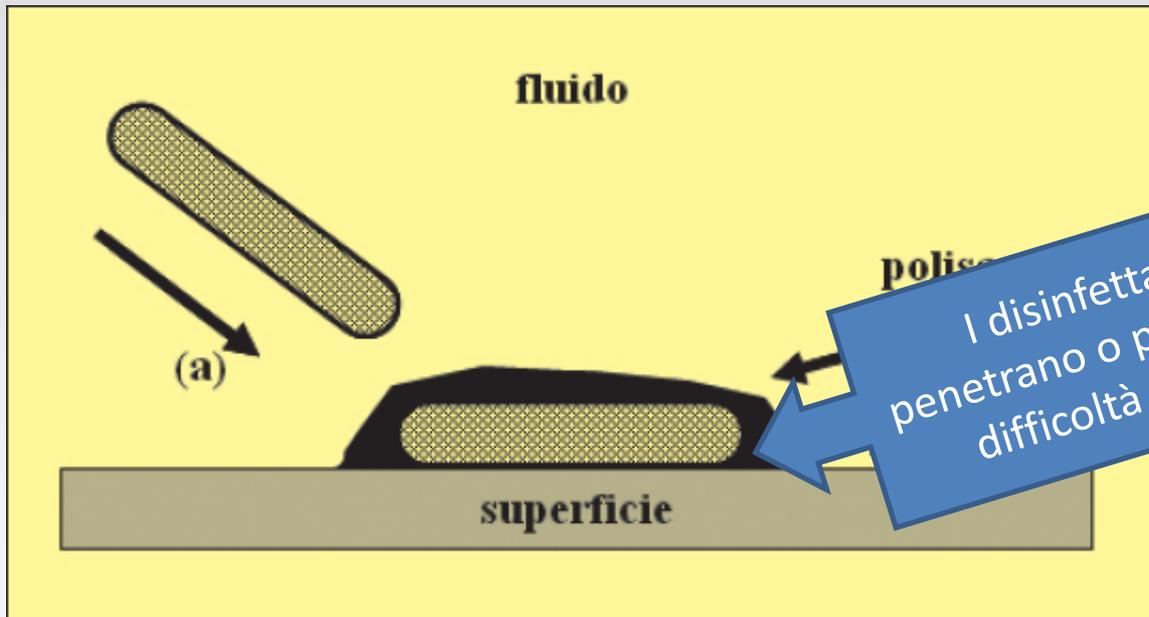
Il processo di condizionamento delle superfici non è indice di sicura formazione di biofilm

- *Fase 2 : adesione reversibile delle cellule*



ADESIONE REVERSIBILE : le cellule in sospensione nel fluido (a) vengono in contatto con la superfici solida (b) quindi si staccano e tornano in sospensione (c)

- *Fase 3 : adesione irreversibile*



ADESIONE IRREVERSIBILE : le cellule in sospensione nel fluido (a) vengono in contatto con la superfici solida (b). Se le forze che trattengono le cellule sulla superficie sono sufficientemente forti le cellule non si staccano e possono produrre esopolimeri che aiutano l'ancoraggio alla superficie

Dove si forma ?

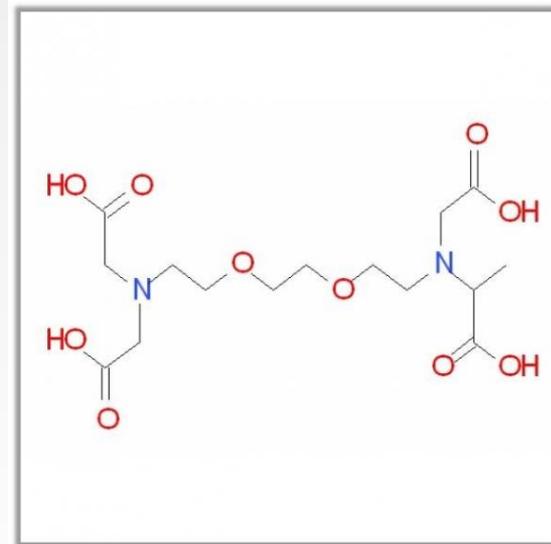
Capacità di diversi materiali di supportare la crescita di biofilm microbici

Capacità di supporto di biofilm	Materiale
pessima	vetro
	acciaio inox
	polipropilene
	PVC
	polietilene
ottima	lattice

Come si rimuove il biofilm ?

- **METODI CHIMICI**

1. Detergenti con effetto chelante
2. Biocidi con effetto ossidante



Capacità dei biocidi di rimuovere i biofilm

Performance del biocida

Principio attivo

ottima

perossiacidi

iodofori

biguanidi

cloro

anfoteri

pessima

quaternari d'ammonio

- **METODI FISICI**

1. Procedure meccaniche (spazzole e/o raschiamento)
2. campi magnetici ad alta frequenza
3. Ultrasuoni
4. Applicazione di campi elettrici pulsati ad alta frequenza

- **METODI BIOLOGICI**

Adsorbimento di molecole bioattive come batteriocine e enzimi sulle superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti

(es. NISINA per ridurre *L. monocytogenes*, batteri lattici e loro estratti per inibire l'adesione di alteranti e patogeni sulla superficie del pollame)

Quanto sopravvivono i batteri sulle superfici ?



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal of Food Microbiology 85 (2003) 227–236

INTERNATIONAL JOURNAL OF
Food Microbiology

www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods

H.D. Kusumaningrum, G. Riboldi, W.C. Hazeleger, R.R. Beumer*

*Laboratory of Food Microbiology, Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen University,
PO Box 8129, 6700 EV Wageningen, The Netherlands*

Received 19 April 2002; received in revised form 9 September 2002; accepted 15 November 2002



Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari



Sono state eseguite **prove di sopravvivenza** di patogeni su superfici di acciaio inossidabile contaminate con spugne contenenti un numero standard di batteri

Microrganismo	Livello di contaminazione	Sopravvivenza
Staphylococcus aureus	$10^3 - 10^5$ CFU/cm ²	4 giorni stesse concentrazioni
	10 CFU/cm ²	2 giorni
Salmonella enteritidis	High level	4 giorni stesse concentrazioni
	Moderate level	Low level dopo 1 ora Non rilevabile dopo 24 ore
Campylobacter jejuni	High level	Non rilevabile dopo 4 ore

Sono state effettuate prove di **cross-contamination** contaminando superfici di acciaio con spugnette impregnate di sospensioni batteriche quindi si è determinata la quantità di microrganismi rilevabili su :

fette di cetriolo appoggiate sulla superficie esercitando e no pressione

Organismo	Livello di contaminazione della spugna	Momento del campionamento	Livello di contaminazione della superficie	% di trasferimento (pressione 500gr/fetta)	% di trasferimento (senza pressione)
Staphylococcus aureus	6,8 ± 0,1 log CFU/spugna	Subito dopo la contaminazione	2,8 ± 0,2 log CFU/cm ²	117 ± 48	95 ± 30
		Dopo 15' dalla contaminazione	2,9 ± 0,1 log CFU/cm ²	100 ± 59	74 ± 41
Salmonella enteritidis	7,3 ± 0,0 log CFU/spugna	Subito dopo la contaminazione	3,0 ± 0,2 log CFU/cm ²	105 ± 26	65 ± 21
		Dopo 15' dalla contaminazione	3,1 ± 0,3 log CFU/cm ²	90 ± 27	50 ± 18
Campylobacter jejuni	8,4 ± 0,1 log CFU/spugna	Subito dopo la contaminazione	4,2 ± 0,2 log CFU/cm ²	185 ± 75	177 ± 72
		Dopo 15' dalla contaminazione	3,8 ± 0,2 log CFU/cm ²	134 ± 89	153 ± 99

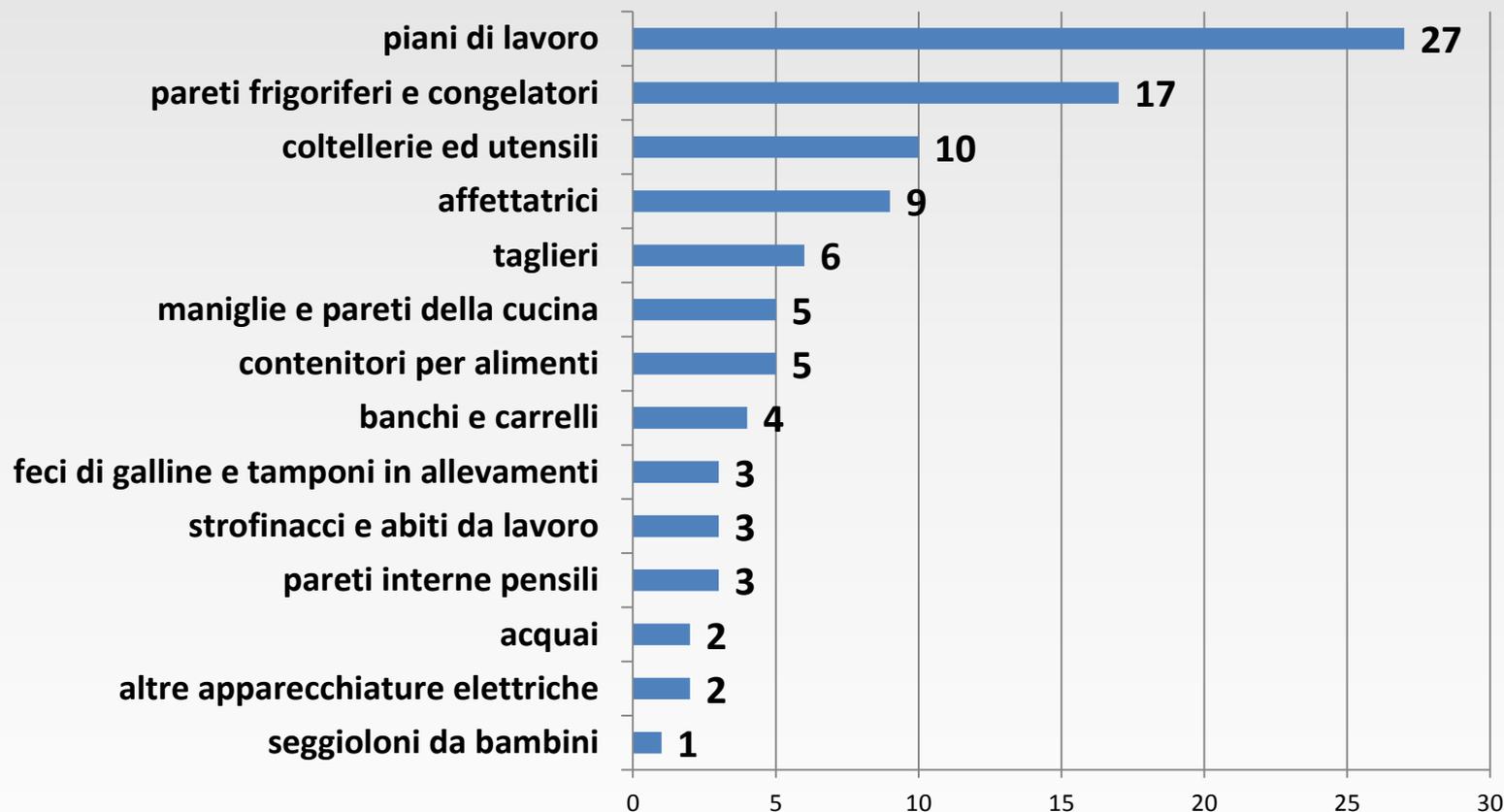
fette di pollo arrostito appoggiate sulla superficie esercitando e no pressione

Organismo	Livello di contaminazione della spugnetta	Momento del campionamento	Livello di contaminazione della superficie	% di trasferimento (pressione 500gr/fetta)	% di trasferimento (senza pressione)
Staphylococcus aureus	6,8 ± 0,1 log CFU/spugnetta	Subito dopo la contaminazione	2,9 ± 0,2 log CFU/cm ²	76 ± 36	62 ± 28
		Dopo 15' dalla contaminazione	2,9 ± 0,2 log CFU/cm ²	74 ± 17	56 ± 20
Salmonella enteritidis	7,3 ± 0,0 log CFU/spugnetta	Subito dopo la contaminazione	3,1 ± 0,3 log CFU/cm ²	94 ± 42	49 ± 21
		Dopo 15' dalla contaminazione	3, ± 0,0 log CFU/cm ²	55 ± 21	32 ± 9
Campylobacter jejuni	8,4 ± 0,1 log CFU/spugnetta	Subito dopo la contaminazione	4,1 ± 0,2 log CFU/cm ²	101 ± 42	66 ± 26
		Dopo 15' dalla contaminazione	3,7 ± 0,4 log CFU/cm ²	24 ± 16	70 ± 83

Le analisi delle superfici a contatto
con gli alimenti nel corso delle
inchieste per focolai di MTA in
Toscana
Anni 2002-2011



Su **339** focolai verificatisi negli anni **2002-2011** sono stati effettuati tamponi di superficie in **49** focolai per un totale di **132** tamponi



I TAMPONI POSITIVI

Focolaio 1	tampone ambientale	Salmonella gruppo D S. aureus
Focolaio 2	Piano di lavoro cucina	L. monocytogens S.aureus
Focolaio 3	strofinaccio usato in cucina	Salmonella enteritidis
Focolaio 4	tampone ambientale	L. monocytogenes
Focolaio 5	superficie macchina del ghiaccio	L. monocytogenes muffe enterobatteri

Focolaio 1

- 2 Agosto 2004
- 12 persone hanno un pasto comune in casa e manifestano sintomi gastroenterici dopo mediamente 30 ore
- 7 coprocolture risultano positive per salmonella gruppo D
- Viene effettuato un sopralluogo nel laboratorio di pasticceria che ha preparato il dolce
- Viene rinvenuta Salmonella gruppo D nella crema pasticcera
- Nelle feci di 8 operatori (?) viene rinvenuta salmonella
- L'analisi delle superfici di lavorazione evidenziano la presenza di Salmonella gruppo D e Stafilococco aureo

Commenti :

1. Non si sa se la crema è la stessa con cui è stata preparata la torta
2. Non viene indicato a quanto tempo di distanza dall'episodio i tamponi sono stati eseguiti e se sono stati eseguiti nel laboratorio o nell'abitazione
3. Non è stata eseguita nessuna tracciabilità sugli alimenti per individuare l'eventuale uso di uova contaminate
4. Probabilmente trattasi di massiccia contaminazione ambientale

Focolaio 2

- 5 Aprile 2006
- 27 ragazzi di gita scolastica da Pordenone manifestano sintomi gastroenterici, con prevalenza di vomito. Non effettuano coprocoltura.
- I pasti a rischio risultano essere stati consumati in ristoranti vari di Siena, Pisa e Lido di Camaiore
- Il sopralluogo nel ristorante di Pisa evidenzia la presenza di *L. monocytogenes* e *S. aureus* sul piano di lavoro della cucina
- Le analisi sugli addetti e sugli alimenti sono tutte negative

Commenti :

1. La non conoscenza del patogeno che ha provocato l'episodio impedisce una correlazione con quanto evidenziato dai tamponi
2. I reperti di positività sulle superfici sono probabilmente occasionali ma evidenziano una cattiva gestione ambientale e dei processi

Focolaio 3



Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari



Indagine epidemiologica 1

16/09/2008 Comunicazione alla U.F. Igiene e Sanità Pubblica attraverso esposto di uno dei commensali

17/09/2008 Intervista a 17 persone da cui :

- periodo medio di incubazione 24 h
- sintomi : dolori addominali, diarrea profusa, vomito, febbre
- complicazioni :

- parto cesareo anticipato
- pancreatite acuta con ricovero c/o U.O. Malattie Infettive

Indagine epidemiologica 2

- N° 15 coprocolture su malati e non-malati di cui :
 - N° 8 positive per *Salmonella enteritidis*
 - N° 7 negative per patogeni intestinali

Definizione di **caso confermato** : persona che ha presentato diarrea e vomito , ha partecipato al pranzo del 14/09/2009 o alla cena del 15/09/2009 e dalla cui feci è stata isolata *Salmonella enteritidis* = 8 persone

Definizione di **caso probabile** : persona che ha presentato diarrea e vomito , ha partecipato al pranzo del 14/09/2009 o alla cena del 15/09/2009 e che non ha eseguito coprocoltura o l'esito è stato negativo = 3 persone

Analisi ambientali

Tipo di campione	Parametri ricercati	Risultato
2 uova guscio	Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, E.coli enteropatogeni, Clostridium	Positivo per Salmonella enteritidis
2 uova tuorlo	Salmonella	Negativo
Pasta pasticciata	Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, E.coli enteropatogeni, Clostridium	Positivo per Salmonella enteritidis
Porchetta	Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, E.coli enteropatogeni, Clostridium	Negativo
Ragù (confezione integra)	Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, E.coli enteropatogeni, Clostridium	Negativo
Strofinaccio da cucina	Salmonella	Positivo per Salmonella enteritidis

ANALISI STATISTICA

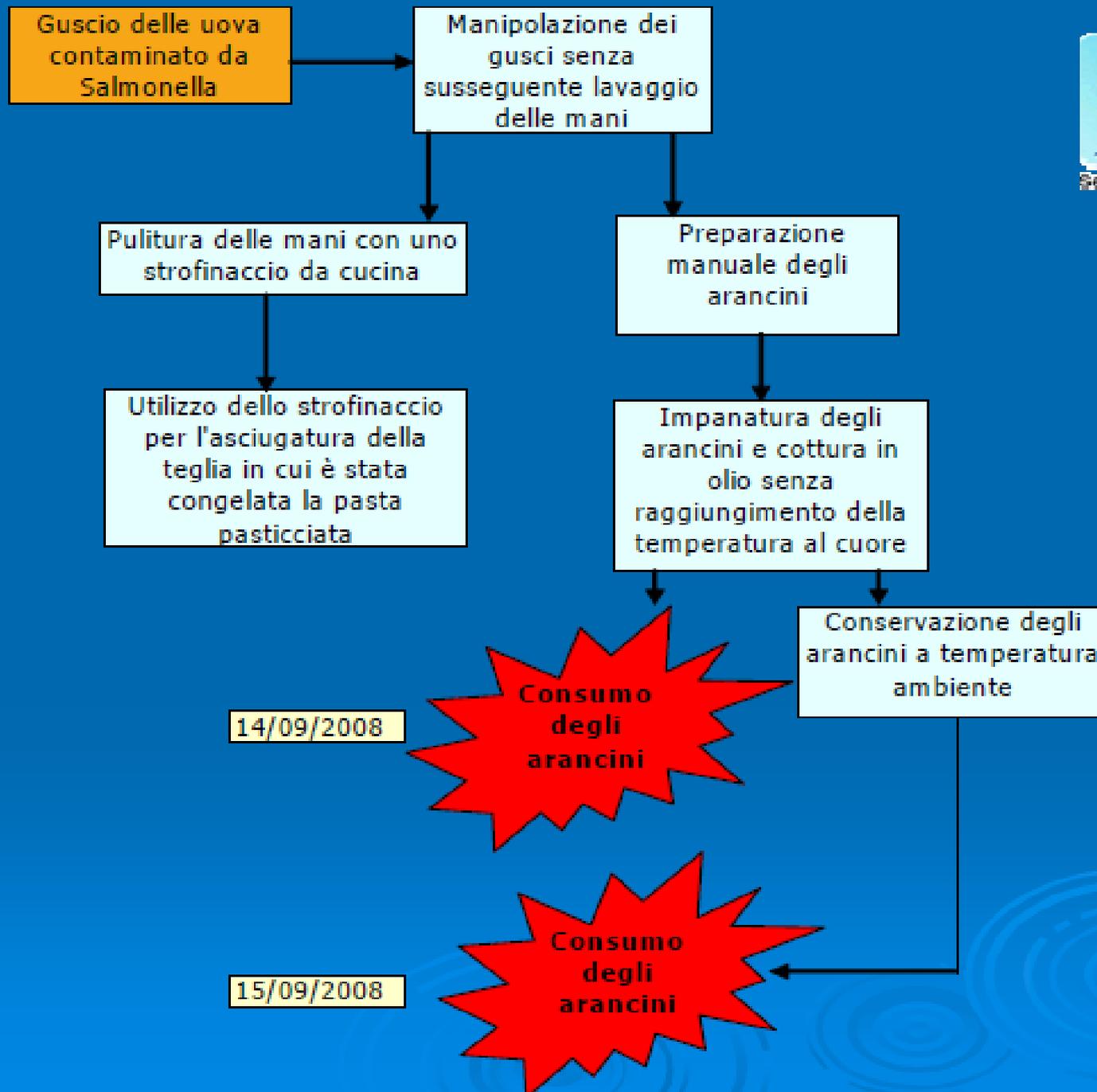
Cibo servito	ESPOSTI		Tasso di attacco specifico	NON ESPOSTI		Tasso di attacco specifico	Totale	Differenze tra i tassi di attacco	Rischio relativo
	Malati	Non malati		Malati	Non malati				
Crostini toscani	8	4	66.7	3	2	60.0	17	6.7	1.11
Arancini siciliani	11	2	84.6	1	3	25.0	17	59.6	3.38
Porchetta arrosto	5	4	55.6	5	3	62.5	17	-6.9	0.89
Piselli	7	4	63.6	4	2	66.7	17	-3.0	0.95
Spinaci	7	4	63.6	4	2	66.7	17	-3.0	0.95
Millefoglie	8	4	66.7	3	2	60.0	17	6.7	1.11

Comunicazioni e informazioni di feedback

- 28/10/2008 – Comunicazione alla Azienda USL 9 di Grosseto – Sicurezza Alimentare competente per territorio sulla Azienda produttrice delle uova
- 13/11/2008 – Comunicazione da parte della Azienda USL 9 dell'esecuzione di campioni di feci ed ambientali nell'Azienda produttrice il cui esito è stato negativo

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEGLI STIPITI

Gli stipiti di *Salmonella enteritidis* isolati dai casi e dagli alimenti sono stati tipizzati tramite Elettroforesi in Campo Pulsato ed hanno mostrato un identico profilo genetico di restrizione . La tipizzazione è stata eseguita dal Reparto Malattie Batteriche Gastroenteriche e Neurologiche dell'Istituto Superiore di Sanità



Focolaio 4

- 28 Agosto 20120
- 9 turisti torinesi consumano in casa vacanze carne macinata e salsicce acquistate presso una norcineria.
- Dopo un periodo medio di incubazione di 10 ore manifestano tutti sintomi gastroenterici. Non eseguono coprocoltura.
- Nel corso del sopralluogo effettuato presso la norcineria, dopo 2 giorni, vengono prelevati carne macinata e salsiccia, non della stessa partita di quelle consumate ed effettuati tamponi superficiali.
- Il laboratorio evidenzia la presenza di Salmonella nella salsiccia e di Listeria monocytogenes nei tamponi ambientali
- Viene sospeso l'utilizzo del locale di sezionamento nel salumificio

Commenti :

1. Non conoscere il patogeno responsabile della patologia umana rende impossibile correlare l'alimento all'episodio
2. Il ritrovamento di *Listeria* sulla superficie è indice di scarsa igiene ambientale ma non è probabilmente legato al focolaio
3. Nessun feed-back sulla positività riscontrata nel campione di alimento – allerta ????

Focolaio 5

- In data **21 Febbraio 2011** i NAS comunicano al Laboratorio di Sanità Pubblica della ASL 3 di Pistoia un presunto focolaio avvenuto il giorno **22 Gennaio 2011** presso un locale del territorio di competenza della ASL 3
- Dall'inchiesta epidemiologica emerge la presenza di 7 ragazzi pratesi con sintomi gastroenterici manifestatisi dopo una media di 48 ore dal momento del consumo del pasto comune. L'unica coprocoltura eseguita risulta negativa per Salmonella, Shigella e Campylobacter. Alcuni ragazzi che hanno manifestato sintomi riferiscono di aver solo bevuto CocaCola con ghiaccio
- Nel corso del sopralluogo effettuato presso la struttura viene prelevata l'acqua del pozzo privato utilizzata per la preparazione degli alimenti e viene effettuato un tampone sulla superficie della macchina del ghiaccio.
- Le analisi evidenziano presenza di enterococchi nell'acqua di pozzo e di Listeria monocytogenes nella macchina del ghiaccio
- Si dispone la chiusura temporanea dell'esercizio

Commenti :

1. La non conoscenza del patogeno responsabile dei casi umani non permette la correlazione con quanto emerso dalle analisi
2. Ritardo abissale nella comunicazione dell'episodio da parte delle Forze dell'Ordine
3. I dati epidemiologici forniti ai tecnici (*alcuni casi hanno solo bevuto*) hanno permesso di sospettare una correlazione con acqua e ghiaccio e di indirizzare il tipo di campione e superficie da analizzare

Altri casi di contaminazione ambientale come probabile causa di focolaio di MTA

- Larciano 2 maggio 2007
- 20 persone consumano un pasto casalingo
- Dopo una media di 24 ore 12 persone manifestano sintomi gastroenterici. Nelle feci viene riscontrata la presenza di salmonella enteritidis.
- Vengono prelevati alimenti residui e non del pasto e viene rinvenuta Salmonella enteritidis in tiramisù al caffè, dolce panna e fragole, scamorza affumicata ed insalata di pomodori. Negativa la ricerca di Salmonella in uova della stessa confezione, mozzarella tritata fresca, salsicce e confezione integra di mozzarella.
- Gli stipiti di Salmonella isolati dai pazienti e dagli alimenti, sottoposti a PFGE mostrano lo stesso profilo elettroforetico (analisi eseguita presso l' ISS)

Commenti :

1. Gli esiti delle analisi mostrano chiaramente come la causa del focolaio sia stata una massiccia contaminazione ambientale (tagliere, mani dell'operatore ???)
2. Il riscontro dell'agente nei casi ha permesso di correlare con forti evidenze (PFGE) la contaminazione ambientale con i casi umani
3. Nessuna notizia sulla tracciabilità delle uova (acquistate alla COOP di Larciano) e su eventuali controlli presso gli allevamenti

- 21 Settembre 2008
- 15 persone consumano insieme un pasto casalingo e dopo 26 ore manifestano sintomi gastroenterici. Le coprocolture sono positive per Salmonella gruppo D
- Le analisi sugli alimenti evidenziano la presenza di salmonella gruppo D in tiramisù, spiedini di pollo fritto e roastbeef. Negativa la ricerca in lasagne e uova
- Negativa la ricerca di salmonella nello sbattitore elettrico, zuppiera e piano di lavoro cucina (prima o dopo le operazioni di pulizia???)
- Nessuna notizia sulla tracciabilità delle uova (acquistate ESSELUNGA) e su eventuali controlli presso gli allevamenti

A PROPOSITO DI FEEDBACK



COMMISSIONE EUROPEA DIREZIONE GENERALE
SALUTE E CONSUMATORI

Direzione F – Ufficio alimentare e veterinario

Da “Relazione di una missione realizzata in Italia al fine di valutare i sistemi esistenti per controllare il rischio di salmonella nelle uova da tavola”

5.4.5. INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE

...le indagini epidemiologiche erano state avviate prontamente, che erano complete e coprivano tutti i dati necessari per la salute dell'uomo e la sicurezza alimentare. Nel corso delle indagini sui focolai è apparsa buona la cooperazione tra la sanità pubblica e gli ispettori veterinari della ASL. Tuttavia non sono state sempre fornite informazioni di feedback.

RACCOMANDAZIONE 3

L'AC dovrà sviluppare mezzi per ricevere feedback sulle indagini epidemiologiche, con particolare riferimento alle ispezioni/indagini che interessano regioni differenti alla luce dell'articolo 4, punto 3 del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio.

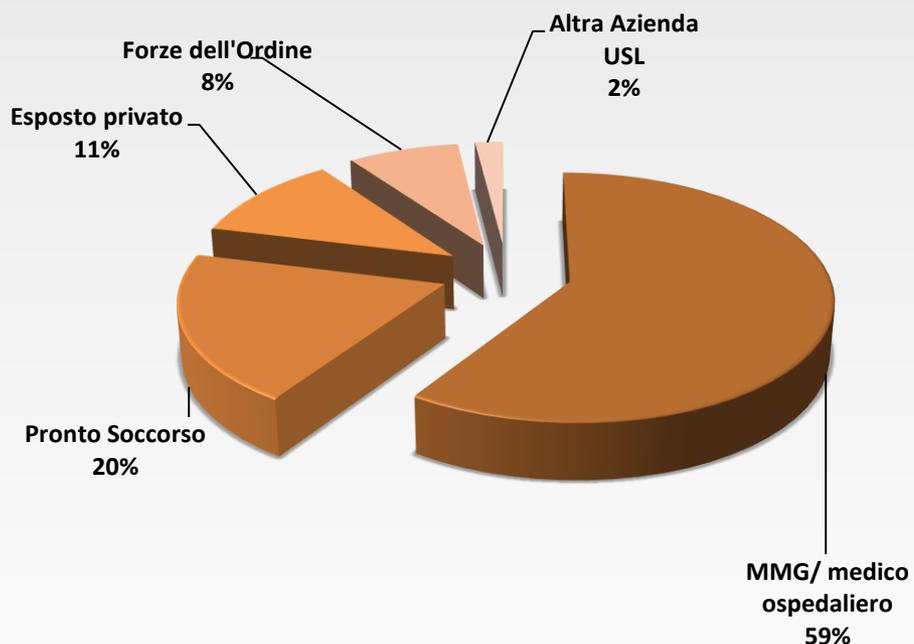
Osservazioni e conclusioni

- Dai dati presentati relativi alle indagini effettuate su superfici a contatto con alimenti in Toscana nel corso di inchiesta per focolaio di MTA non sembra che le indagini siano stati capaci di fornire nessi causali con forti evidenze.
- Nei casi in cui sono state riscontrate superfici positive per patogeni le uniche conclusioni risultate possibili sono state quelle dell'evidenza di una cattiva igiene ambientale e di gestione dei processi
- Le inchieste si riferiscono quasi tutte a focolai familiari

E allora ?

- Le analisi delle superfici nel corso di MTA acquistano un significato se :
 - E' noto il patogeno responsabile dell'episodio
 - I tamponi vengono eseguiti immediatamente dopo l'episodio e prima delle operazioni di pulizia effettuate nei locali
 - I tecnici sono in possesso di notizie emerse dall'inchiesta epidemiologica che possono in qualche modo indirizzare sul tipo di superficie da campionare e su quali patogeni ricercare
 - Si è certi che la contaminazione di una superficie è stata responsabile di contaminazione di alimenti e questo è possibile solo se sono state chiariti i flussi di lavorazione e la gestione dei processi (presenza di alimenti ready-to-eat nel menù, livelli di cottura inadeguati, processi di sanificazione non idonei)

I tempi di notifica e segnalazione



PROVENIENZA	Media (gg)	Mediana (gg)
Tutti	5.28	2.00
MMG/ medico ospedaliero	7.97	5.00
PS	0.85	1.00
Esposto privato	1.35	1.00
Forze dell'Ordine	4.0	2.0
Altra ASL	2.0	

BUON LAVORO A TUTTI !!!



Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari

