

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO
Scienze biomediche cliniche e sperimentali

DIPARTIMENTO
Scienze della salute

CORSO DI DOTTORATO
Sanità pubblica

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Sorveglianza epidemiologica e molecolare della listeriosi in Regione
Lombardia, 2005 - 2012

DOTTORANDA: Anna Guaita
Matricola: R08657

RELATORE: Chiar.ma Prof.ssa Mirella Maria Pontello

A.A.2012

...a Lucy, Mamy, Babbo e Angelo

RIASSUNTO

Nei Paesi industrializzati, la listeriosi invasiva, nonostante la sua bassa incidenza, è un'infezione alimentare di grande impatto per la salute pubblica, a causa della gravità delle sue manifestazioni cliniche e dell'alto tasso di letalità. In Europa, fra il 2005 e il 2009, sono stati notati incrementi statisticamente significativi delle notifiche di listeriosi in diversi Stati europei (Austria, Danimarca, Ungheria, Italia, Spagna e Svezia). In Italia le informazioni riguardo l'infezione risultano lacunose ed, in alcune Regioni, assenti.

Gli obiettivi di questo studio sono: 1) descrivere la listeriosi in Regione Lombardia; 2) analizzare i ceppi di *L.monocytogenes* mediante sierotipia, elettroforesi pulsata (PFGE), sequenziamento (MLST); 3) incrociare le informazioni dei database in esame mediante l'utilizzo del metodo statistico "Cattura-Ricattura" e analizzare statisticamente l'andamento spazio-temporale.

Lo studio analizza e compara i dati ed i ceppi raccolti dal 2005 al 2012 attraverso una Sorveglianza speciale di Laboratorio e il database regionale che raccoglie le notifiche (MAINF). Sono stati collezionati 192 ceppi di *L.monocytogenes* dalla Rete di Laboratorio, mentre, nello stesso arco di tempo, 366 casi sono stati notificati in MAINF. Nel 2011 si osserva un notevole aumento di casi in entrambi i sistemi di sorveglianza. I casi *pregnancy-related* sono stati 24. I casi non correlati alla gravidanza sono sopra i 65 anni (36%) e l'83% presenta fattori di rischio sottostanti (HIV, diabete, cancro,...).

Analizzando i ceppi microbiologicamente, il sierotipo più frequente risulta essere 1/2a (59.5%), seguito da 4b (28.1%) e 1/2b (9.1%). Mediante l'utilizzo della PFGE abbiamo evidenziato 15 pulsotipi dominanti e un grande cluster costituito da 39 ceppi distribuiti tra il 2010-2011. Dodici risultano essere gli ST più frequenti ottenuti dall'MLST; dall'analisi della banca-dati dell'Istituto Pasteur, l'ST 21 è stato isolato solo in uomo e roditori. Le tecniche molecolari risultano concordi e sovrapponibili nei risultati.

Incrociando i due database mediante il metodo "Cattura-Ricattura" abbiamo evidenziato una sottosima del numero di casi in entrambi i sistemi di sorveglianza, anche se vi è un miglioramento progressivo negli anni da parte della Rete di Laboratorio.

L'analisi statistica spazio-temporale denota una distribuzione non casuale dei ceppi appartenenti al più grande pulsotipo riscontrato, portandoci a confermare l'ipotesi di un cluster epidemico.

I risultati del nostro lavoro di sorveglianza risultano soddisfacenti. Molto utile è stato integrare i dati epidemiologici, clinici e di laboratorio provenienti dai due database presenti in Regione Lombardia. La sorveglianza della listeriosi merita un aumento della sensibilità e della tempestività dei sistemi al fine di identificare i cloni epidemici e le fonti d'infezione.

ABSTRACT

Listeriosis is a rare but severe disease emerging especially in fragile subjects, likely due to association with deprivation. *Non pregnancy-related* infections, food-acquired, mainly affect immunocompromised and older subjects. Considering the aging of national and regional population and the increase of immunosuppressant therapy and pathologies is crucial to increase the knowledge about *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) infection.

The objectives of this study are: 1) describe listeriosis in Lombardy Region; 2) analyze *L. monocytogenes* strains with serotyping, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and MultiLocus Sequence Typing (MLST); 3) cross-match the information with capture-recapture method and statistical analysis.

We analyzed the collected data over eight years (2005-12) from special laboratory surveillance network (LSN), comparing with Lombardy database of infectious disease (MAINF) data, reported over the same period and we underlined the critical points. In 2005-2012, 192 strains of *L.monocytogenes* were collected from laboratory network while 366 invasive listeriosis cases were notified to MAINF surveillance system. In the 2011 we observed an increase of cases either in the MAINF (i.e 73 cases) or in the LSN (i.e. 44 *L. monocytogenes* strains) database. The pregnancy-related cases were 24 (only one from a mother-child pair), while the non-pregnancy related ones were 168. The 36% of these 168 were over 65 years old and 83% had underlying risk factors (HIV, diabetes, neoplastic disease,...).

Analyzing the *L. monocytogenes* strains we found that the most common serotypes were 1/2a (59.5%), 1/2b (9.1%), and 4b (28.1%). By using PFGE we realized that collected by LSN strains were characterized by 15 pulsotypes based on the PFGE profiles; 10 clusters were identified and the largest cluster included 39 isolated strains, identified along the whole considered period. The MLST technique gave twelve sequence types (ST). In the most numerous sequence type we recognised 39 *L. monocytogenes* strains; the ST number 21 was found in human cases but also in rodents.

We compared two surveillance systems with the estimated amount of cases noting that the observed cases were underestimated. This tells us that our surveillance systems miss information. The statistical analysis underlined that the temporal distribution of cases was not random, but instead the cases concentrated in 2010 and 2011.

The results of our surveillance work are satisfactory and we think that it is useful to compare and analyze the microbiological and epidemiological data coming from two sources to increase the statistics. The laboratory-based surveillance network of listeriosis can improve in sensitivity to better and more quickly detect cases, contribute to identify epidemic clones, and investigate the infection source.

INDICE GENERALE

***Introduzione**

- Listeria

Tassonomia

Caratteristiche microbiologiche

Elementi di resistenza

Elementi di patogenicità

Reservoir

- Epidemiologia delle foodborne disease

- Listeriosi

Epidemiologia

Vie di trasmissione

Patogenesi

Fattori di rischio

Clinica

- Forme materno-fetali

- Forme non materno infantili

Diagnosi

Terapia

Prevenzione

Prognosi

Sorveglianza

***Obiettivi**

***Materiali e metodi**

Studio epidemiologico della listeriosi in Lombardia

- Database di raccolta delle notifiche: MAINF

- Database di raccolta schede di dimissione ospedaliera (SDO)

- Database di raccolta degli stipiti batterici: Rete Di Laboratorio

Incrocio dei sistemi di sorveglianza per stimare l'incidenza reale di listeriosi mediante l'utilizzo del metodo statistico Cattura-Ricattura

Tipizzazione Biomolecolare Mediante PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Tipizzazione Biomolecolare Mediante MLST (MultiLocus Sequencing Typing)

Sierotipizzazione

Analisi statistica

***Risultati**

Analisi epidemiologica descrittiva

Analisi statistica mediante l'utilizzo del metodo Cattura-Ricattura

Analisi biomolecolare:

- Sierotipo

- PFGE

- MLST

Analisi statistica

***Discussione**

***Bibliografia**

***Allegati**

Protocollo PulseNet

Scheda di notifica del sistema di sorveglianza basato sulla Rete di Laboratorio

Scheda di notifica del sistema di sorveglianza MAINF

INTRODUZIONE

Listeria monocytogenes

Tassonomia

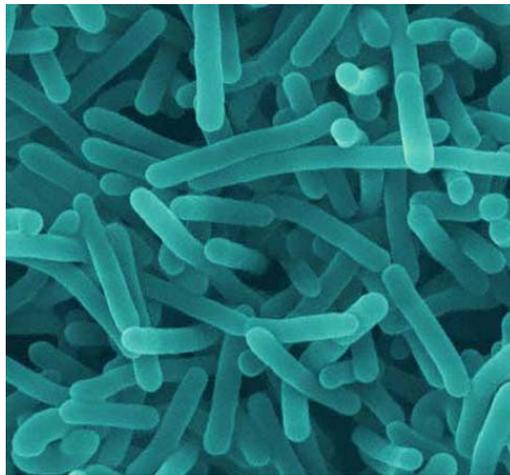
Il genere *Listeria* fa parte della Famiglia delle *Listeriaceae*, che si annovera nell'ordine del *Bacillales*, che rientra nella classe dei bacilli, nella divisione *Firmicutes* del regno dei batteri.

Ad oggi sei specie possono essere annoverate nel genere *Listeria*, ciascuna delle quali presenta caratteristiche differenti di patogenicità e di specie-specificità: *L.monocytogenes*, patogena per l'uomo e per gli animali, è agente eziologico della listeriosi umana, *L.ivanovii* patogena solo per gli animali, mentre *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* e *L.grayi* non sono stati attribuiti finora elementi di patogenicità (1).

Caratteristiche microbiologiche

L.monocytogenes è un bastoncello gram positivo, con dimensioni di 0.4-0.5 per 0.6-2 micron, asporigeno, acapsulato, di colore giallo se coltivato su terreni arricchiti (Tryptone Soy Agar, TSA), ma dal caratteristico colore azzurro-grigio se coltivato su terreni specifici (Lithium Chloride-Phenylethanol-Moxalactam) (Figura 1) (1), dotato di numerosi elementi che ne permettono la sopravvivenza anche in ambienti normalmente ostili alla maggior parte dei microrganismi: infatti è aerobio-anaerobio facoltativo, crioresistente, osmoresistente, dotato di flagelli (2).

Figura 1. *Listeria monocytogenes* al microscopio ottico coltivata su Lithium Chloride-Phenylethanol-Moxalactam.



Elementi di resistenza

L.monocytogenes è un saprofito ambientale a distribuzione ubiquitaria grazie alla presenza di importanti elementi di resistenza, capace di provocare un ampio spettro di quadri clinici che rappresentano un importante problema nell'ambito della sanità pubblica mediante meccanismi di patogenicità altamente invasivi (3).

Listeria sopravvive in presenza di temperature comprese tra i 2 e i 45°C, grazie a cambiamenti a carico dei lipidi di membrana, che permettono il mantenimento della fluidità adatta alla sopravvivenza e soprattutto alla replicazione in presenza di basse temperature, all'espressione di *cold shock proteins* o di altre proteine di stress e all'accumulo intracellulare di crioprotettori come la carnitina. Questa caratteristica di *Listeria* rende quindi vano l'utilizzo della catena del freddo nella conservazione degli alimenti, che saranno un importante veicolo di contagio. Il microorganismo è incapace di resistere ad una temperatura di 60°C protratta per almeno 30 minuti.

Listeria monocytogenes mostra anche una grande resistenza a stress chimici, ottenuta grazie a sofisticati meccanismi di omeostasi interna basati sulla presenza di trasportatori di membrana e di sistemi tampone, motivo per cui è in grado di sopravvivere a pH acido quale quello che si riscontra in sede gastrica, all'interno dei fagosomi contenuti nei macrofagi e che è largamente utilizzato

nell'industria alimentare per garantire la sicurezza igienica degli alimenti. Inoltre, l'esposizione del microorganismo a pH acidi induce l'espressione di geni di resistenza che potenziano la capacità del batterio di sopravvivere anche a stimoli ambientali di diverso tipo (termico, osmotico, etc.).

Nell'ambito della resistenza osmotica, *Listeria m.* ha la capacità di percepire l'osmolarità circostante e di variare quella intracellulare al fine di raggiungere uno stato di isotonicità con l'ambiente esterno; infatti il batterio è in grado di sintetizzare e accumulare nel citoplasma proteine elettricamente neutre, ma osmoticamente attive, impedendo così la disidratazione cellulare in ambiente ipertonico. Per questo motivo, un altro dei metodi più antichi utilizzati per la conservazione alimentare, la conservazione in ambiente saturo di sale, non ha effetto protettivo nei confronti di *Listeria*.

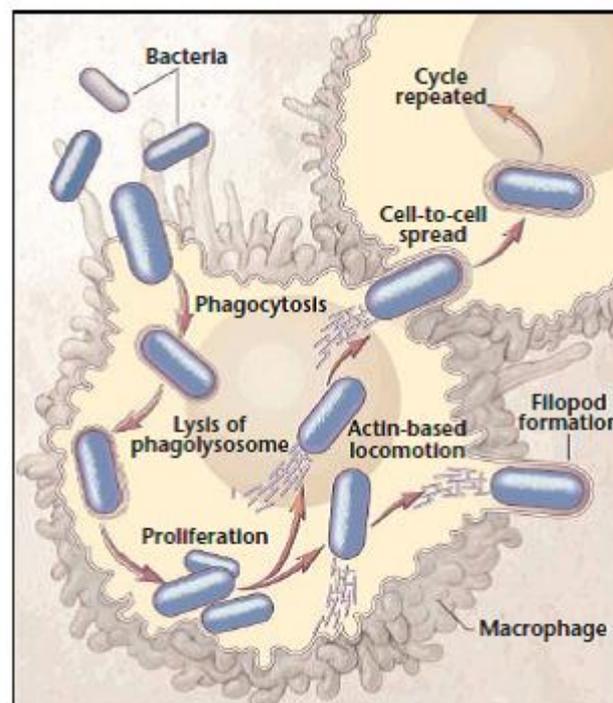
Altro fattore di importanza notevole per la resistenza del microorganismo in condizioni estreme è la produzione di biofilm, ossia una matrice composta da polisaccaridi; questo sottile strato protettivo è una barriera contro disinfettanti e igienizzanti nella catena dell'industria alimentare, previene la disidratazione del batterio in condizioni non favorevoli e aumenta le capacità di adesione a differenti matrici (4).

Elementi di patogenicità.

Nell'ambito degli elementi di patogenicità, recentemente è stato possibile individuare i prodotti di alcuni geni che, attivandosi in risposta ad uno stress, garantiscono al microorganismo non solo la sopravvivenza, ma anche l'innesto di processi consequenziali culminanti nell'infezione propriamente detta. *L.monocytogenes.* è in grado di penetrare e moltiplicarsi in una grande varietà di cellule, compresi i macrofagi ed altre cellule con funzione fagocitica aspecifica, umane e animali, ma è stata documentata, come per altri patogeni intracellulari, la possibilità di riprodursi anche in protozoi, quali le amebe e alcune specie di *Drosophila*. Per questo motivo si pone il dubbio che, non solo nell'individuo ospite, ma anche nell'ambiente, *Listeria* potrebbe essere un saprofito inerte caratterizzato unicamente da elementi di resistenza, poiché deve combattere una battaglia

territoriale che ne rinforza i meccanismi di patogenicità. *Listeria m.* è dotata di: internaline, proteine di superficie che ne permettono l'ingresso nella cellula ospite; listeriolisine colestreolo-dipendenti, che prevengono il contatto con il sistema vacuolare cellulare in modo tale da evitare la distruzione litica; una proteina flagellare responsabile della motilità del microorganismo nel citoplasma e della diffusione cellula-cellula (Figura 2).

Figura 2. Meccanismi dell'infezione cellulare di *Listeria monocytogenes* (Janakiraman V. Listeriosis diagnosis, treatment and prevention).



L. monocytogenes produce alcune metalloproteasi ed un trasportatore di esosi fosfati che le permettono di utilizzare gli zuccheri fosforilati come fonte energetica all'interno della cellula. Recentemente è stata identificata un'idrolasi dei sali biliari, che potrebbe render conto della capacità del batterio di sopravvivere nel piccolo intestino, così come nella vie biliari.

Il principale coordinatore di tutti questi elementi di patogenicità sopra citati è il *Positive regulatory factor A (PrfA)*, che in risposta a differenti stimoli induce la trascrizione delle proteine di resistenza appropriate al tipo di stress (ossidativo, chimico, termico, etc.).

Quando *Listeria m.* viene ingerita da un potenziale ospite umano, attraversa numerosi ambienti con pH differenti; la sopravvivenza al pH gastrico è tanto più probabile quanto più il microrganismo è virulento per sua natura e, oltrepassata la barriera gastrica, il microrganismo acquisisce un fenotipo ancora più aggressivo; ciò è dimostrato nei modelli murini in cui il contagio enterico con questa modalità è quello che dà forme cliniche più aggressive. Il bacillo giunto nell'intestino tenue, dove l'ambiente risulta più idoneo, invade la cellula ospite in cui l'ambiente è per l'ennesima volta sfavorevole, fatto che contribuisce ad aumentare la virulenza (3).

Reservoir.

L. monocytogenes è diffusa in modo ubiquitario nell'ambiente, grazie alle sue straordinarie caratteristiche di resistenza; ampiamente presente nel suolo, nelle acque superficiali, nei liquami, nei concimi (5). Il batterio può esistere in condizioni del tutto asintomatiche nell'intestino di mammiferi selvatici e uccelli, che possono così disseminarlo con le loro feci, ma anche gli animali da allevamento possono contribuire alla contaminazione dell'ambiente, soprattutto mediante l'utilizzo di stallatico come concime. Tra gli animali, i ruminanti sono gli animali più a rischio, mentre i suini così come gli uccelli, pur contraendo spesso l'infezione, sviluppano raramente la malattia e per questo possono esser definiti portatori. E' stato stimato che l'80-90% dei casi riportati in Nord America avvengono nei bovini, mentre la restante parte quasi esclusivamente nelle pecore (6).

Vista l'enorme diffusione di *L. monocytogenes* nell'ambiente, è intuitivo come facilmente possa verificarsi una contaminazione degli alimenti, che si renderà responsabile della trasmissione del microrganismo all'uomo, a cui farà seguito o meno un'infezione conclamata; a questo proposito è rilevante la presenza asintomatica di *L. monocytogenes* nelle feci dell'1-5% della popolazione sana, ma si è riscontrata una contaminazione che raggiunge il 25% in alcuni gruppi, compresi coloro che

si occupano di pazienti con fattori di rischio per la listeriosi manifesta (7). Alcuni studi affermano che un individuo sano ha mediamente due episodi di infezione enterica asintomatica in un anno, che durano circa 4 giorni e non presentano complicanze (8). La contaminazione degli alimenti avviene con modalità diverse a seconda del cibo considerato e la comprensione completa di queste modalità non può prescindere dalla conoscenza dell'iter a cui il prodotto è sottoposto prima di giungere all'alimento finito così come il consumatore lo acquista (9).

Dunque è importante considerare la preparazione e il tipo di conservazione e soprattutto a fenomeni di *cross-contamination*, poiché *L. monocytogenes* è in grado di formare biofilm che facilitano l'adesione e la sopravvivenza del batterio. Per quanto riguarda le carni, la contaminazione avviene mediante contatto con altri alimenti o durante la fase di lavorazione. I prodotti caseari possono essere contaminati alla base dell'iter di lavorazione: durante la mungitura, perché il latte proviene da mucche che hanno una mastite asintomatica o può essere contaminato da microrganismi di provenienza ambientale, anche tramite il personale deputato al processo. Qualora il latte venga utilizzato senza essere pastorizzato, al fine di produrre alimenti per la cui manifattura non è prevista una successiva cottura, *Listeria* può proliferare e ritrovarsi nel prodotto finito, mentre, se il latte viene pastorizzato la contaminazione non può che essere successiva al trattamento termico ed è particolarmente favorita nei formaggi a venatura blu, a causa delle loro particolari caratteristiche biochimiche (pH elevato, alta idratazione, ridotta concentrazione di sale). Anche il modo in cui il prodotto viene venduto influenza nettamente le possibilità di contaminazione, per cui risultano più a rischio gli alimenti che vengono maneggiati dall'operatore.

Anche i vegetali sono risultati un importante veicolo di contagio, tanto che una delle prime epidemie, in particolare quella a seguito della quale è stato possibile comprendere la trasmissione alimentare (Canada 1981), ha visto coinvolto il cavolo. Comprendere in modo esaustivo l'esatta modalità in cui avviene la contaminazione è risultato complesso: possono essere imputati la presenza del batterio nel suolo, la diffusione dei patogeni da parte degli animali infetti, l'utilizzo di pratiche agricole scorrette (irrigazione con acque contaminate o fertilizzazione con concimi naturali

non sterili), la manipolazione umana che avviene durante e in seguito alla raccolta dei vegetali e il confezionamento di imballaggi con caratteristiche straordinariamente adatte alla proliferazione batterica, non solo di *L. monocytogenes* (alto tasso di umidità), come avviene nei prodotti ready-to-eat. E' inoltre importante notare come alimenti di per sé non permissivi alla replicazione del microrganismo possono comunque contenere una carica batterica idonea a causare una patologia se ingeriti da individui predisposti (donne in gravidanza, immunodepressi,...), ma anche a causare una cross-contamination di alimenti che hanno caratteristiche tali da permettere una replicazione importante di *Listeria* (9).

Per quanto riguarda la prevalenza della contaminazione degli alimenti, i dati percentuali variano a seconda dello studio considerato, ma quello che emerge in modo univoco è che non si tratta di valori irrilevanti, superando, in certi alimenti, il 60%.

I prodotti ready-to-eat a base di carne, come salami, prosciutti e paté, la contaminazione è risultata molto variabile a seconda dell'area geografica considerata, per cui negli Stati Uniti la percentuale è oscillante tra lo 0.4 e il 71%, in Canada fra lo 0 ed il 21%, mentre in Europa il dato varia a seconda della nazione considerata, con il 27% in Spagna il 35%, in Gran Bretagna (10), il 50,4% in Italia (11); le cause di questa variabilità sono legate a differenze negli elementi facenti parte la sorveglianza quali l'effettiva incidenza e l'assetto dei sistemi preposti ad essa.

Nell'ambito dei prodotti ittici il 18.3% dei campioni di salmone affumicato è risultato contaminato (10), mentre *Listeria* è stata isolata dal 27.9% dei prodotti ittici esaminati in Italia dal 1990 al 1999 (11); controversi sono i dati riguardanti i prodotti caseari ottenuti da latte pastorizzato, poichè in Europa le percentuali di contaminazione sono mediamente inferiori al 3%, mentre in Italia i dati sono superiori, con un valore del 17.4% (11). Le carni vendute crude risultano contaminate per il 1-3%, ma in alcune casistiche si attestano intorno al 10-20%. Per quanto riguarda le verdure, in Canada è nota la contaminazione del 10% dei prodotti crudi, mentre in Italia il microrganismo è stato isolato nel 4.5% dei campioni di prodotti vegetali pronti al consumo, come insalate pronte e verdure in lattina (11).

Epidemiologia delle *foodborne disease*

Lo studio dell'epidemiologia delle patologie a trasmissione alimentari presenta una serie di difficoltà, legate ad una concomitanza di fattori che rendono l'approccio complesso; innanzitutto un alimento può essere contaminato da più agenti patogeni e questo fa sì che l'indagine epidemiologica basata sulla ricerca del prodotto implicato possa essere poco indicativa, tanto che solo il 19% dei casi identificati come patologie a trasmissione alimentare negli USA si riesce a raggiungere una chiara consapevolezza eziologica (10). In secondo luogo tipiche *foodborne disease* possono essere contratte con meccanismi non alimentari, come attraverso il contatto diretto con animali o tramite l'ingestione di acque alimentari; in terzo luogo il manifestarsi o meno della patologia è dipendente da una serie di fattori legati al microrganismo e all'ospite come ultima problematica, c'è il fatto che solo in una piccola percentuale di casi i clinici provvedono all'isolamento del patogeno e alla successiva modifica agli enti preposti.

La world health organization (WHO) ritiene che le *foodborne* rappresentino la principale causa di morte per diarrea con oltre 2 milioni di decessi nel mondo nel 2000, ed è stato stimato che il 30% della popolazione dei paesi industrializzati contrae attualmente un'infezione o una tossinfezione alimentare.

L'incidenza di queste patologie è andata globalmente aumentando nel corso degli anni e la loro eziologia si è modificata radicalmente nel tempo. Infatti nel corso del XX secolo, nei paesi industrializzati, l'epidemiologia delle *foodborne disease* ha subito notevoli cambiamenti, dovuti in parte al miglioramento delle condizioni igienico sanitarie, in parte al profondo modificarsi delle abitudini alimentari e dell'approccio al cibo della popolazione, ma anche all'aumento dei pazienti con fattori di rischio per patologie infettive, quali gli anziani, gli immunodepressi e i pazienti neoplastici. Patologie un tempo diffuse, come febbre tifoide, colera e poliomielite, sono ormai rare, mentre si sono diffuse sempre più infezioni causate dai microrganismi quali i sierotipi non tifoidei di Salmonella, i patogeni del genere *Campylobacter* e il parassita *Cyclospora* e sono emerse

patologie dall'esito spesso grave quali la malattia prionica di Creutzfeld-Jacob o l'infezione da *L. monocytogenes* (12).

I fattori legati al cambiamento epidemiologico che è avvenuto nell'ambito delle foodborne disease sono dovuti alla perdita di uno stretto rapporto tra popolazione e consumo, con l'interposizione tra questi due elementi di una serie di tappe e processi, quali il trasporto e la conservazione, che possono presentare punti critici nell'ambito della sicurezza alimentare. Lo spostamento delle merci tra le differenti sedi o nazioni, lo sviluppo di scambi commerciali e d'importazioni da nazioni con legislazioni alimentari non rigide come quelle europee, la distribuzione di prodotti su vasta scala attraverso passaggi che possono interrompere temporaneamente la catena del freddo, espongono il prodotto ai rischi di contaminazione e sviluppo microbico (12). Le abitudini alimentari della popolazione residente nei paesi industrializzati sono mutate in modo considerevole, con un numero sempre più elevato di pasti procapite consumati fuori casa, per quanto esistano enti preposti al controllo della sicurezza alimentare in ambito ristorativo, l'attenzione e l'educazione degli esercenti e dei consumatori non devono venire meno.

Un'ultima problematica è legata all'igiene alimentare in ambito domestico, poichè il food-handler si trova sempre più a dover provvedere alle necessità delle fasce della popolazione a maggior rischio infettivo e ciò comporta una responsabilità anche a livello di salute pubblica.

Le infezioni acquisite durante i viaggi, soprattutto nei paesi del terzo mondo, in cui le condizioni igienico-sanitarie sono scarse, nella valutazione globale dell'epidemiologia delle foodborne disease rappresentano una minoranza, basti pensare che oltre il 90% delle patologie a trasmissione alimentare negli USA si stima abbia un'acquisizione domestica (13). Negli USA è stimata un'incidenza annua di 9.4 milioni di casi di patologie a trasmissione alimentare su una popolazione di circa 299 milioni di persone, causate da 31 diversi microrganismi; di questi casi 5.5 milioni sono causati da virus (59%), 3.6 milioni da batteri (39%) e 0.2 milioni da parassiti (2%) e i patogeni più coinvolti sono risultati essere i *Norovirus* (58%), le Salmonelle non tifoidee (10%), *Clostridium perfringens* (10%) e le *Campylobacteriacee* (9%).

I patogeni coinvolti variano molto a seconda della fascia d'età, con la prevalenza di *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* tra i batteri che colpiscono i bambini di età inferiore a 5 anni e un'aumentata incidenza di listeriosi e infezioni da *Vibrio* spp. nella fascia d'età superiore ai 60 anni (14). I casi annui di ospedalizzazione legati al contagio da parte dei 31 patogeni responsabili di tali patologie sono circa 56 mila e all'origine vi è nel 64% dei casi un'eziologia batterica, nel 27% di origine virale e nel 9% parassitaria; i patogeni più coinvolti sono i sierotipi non tifoidee di *Salmonella*, *Norovirus*, *Campylobacter* e *Toxoplasma gondii*. I decessi causati da queste patologie sono 1300 circa all'anno e responsabili sono stati i sierotipi non tifoidei di *Salmonella* nel 28% dei casi, *Toxoplasma gondii* nel 24%, *Listeria monocytogenes* nel 19% dei casi e *Norovirus* nell'11% (14).

A proposito dei dati citati è sempre importante considerare che, anche se rappresentativi, non possono essere considerati esaustivi, in quanto si basano su malattie diagnosticate e confermate attraverso test di laboratorio, una prassi ancora non così generalizzata per le infezioni alimentari, e spesso non vengono segnalate nei sistemi di sorveglianza epidemiologica esistenti, soprattutto quando la forma clinica non è impegnativa.

L'epidemiologia delle *foodborne disease* in Europa, dai dati presenti nell'ultimo rapporto Efsa, emerge che nel 2009 nell'Unione Europea sono stati segnalati 5550 focolai di tossinfezioni alimentari responsabili di 48964 casi nell'uomo, 4356 ricoveri e 46 decessi. I batteri più comunemente coinvolti sono risultati *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *E.coli*, *Yersinia*, *Shigella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, tuttavia non mancano casi di patologie causate dall'ingestione di tossine batteriche, come quelle prodotte da *Staphylococcus aureus*, dal *Clostridium botulinum* e dal *Bacillus cereus*. Nel 2009 all'interno dell'Unione Europea è stato registrato un decremento dei casi di infezioni alimentari dovute a *Salmonella* (100000 casi confermati, con una riduzione del 17,4% rispetto al 2008), e un incremento dei casi confermati di Campylobatteriosi (quasi 200000 casi confermati) e di listeriosi umana (1645 casi confermati, con un incremento del 19,1%) (15)

Nel 2009 in Italia, le segnalazioni di focolai di infezioni alimentari segnalate sono state 248; per ogni focolaio, il totale di casi è stato pari a 1451. L'Emilia Romagna è risultata essere la regione che notifica il maggior numero di episodi (20%), seguita da Piemonte (15%), Bolzano (14%), Lazio (10%) ed il resto delle regioni. I microrganismi implicati nell'eziologia degli episodi sono Salmonelle spp. 45% e forme virali 17%. *Campylobacter* risulta essere implicato solo nell'1.2% dei casi, al contrario di quanto osservato in altri Paesi Europei. Il 33% dei focolai epidemici non presenta indicazione sull'eziologia o non specifica il microrganismo responsabile (12). Una seconda problematica riguardante l'epidemiologia delle *Foodborne disease* è legata al fatto che le forme la cui presentazione avviene con pattern epidemico vengono notificate in classe IV, mentre i casi sporadici rientrano nella notifica in classe II, motivo per cui è difficile stimare l'incidenza delle infezioni causate da ciascun patogeno. Più complesso risulta stimare l'incidenza di queste patologie nei paesi in via di sviluppo, dove le condizioni igieniche precarie, l'assenza di prevenzione e di una cultura di conservazione dei cibi rendono più difficile la preservazione di alimenti non contaminati. Un obiettivo di WHO per il futuro consiste nel cercare di raggiungere un consenso internazionale, al fine di valutare i rischi alimentari e mettere a punto un sistema globale di sorveglianza delle malattie alimentari che coinvolga tutti i paesi del mondo.

Gli enormi cambiamenti che hanno interessato il sistema alimentare europeo, nel quale gioca un ruolo fondamentale la conservazione degli alimenti, ci pongono oggi di fronte a nuovi problemi e punti critici da risolvere per garantire la sicurezza alimentare.

A questo proposito l'Europa sta introducendo nuove strutture e metodologie che garantiscano la sicurezza degli alimenti attraverso il controllo dell'intera catena alimentare, secondo il principio "*from farm to fork*".

A livello mondiale l'organismo che più si è dedicato al tema della sicurezza alimentare è la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), congiuntamente con la WHO (World Health Organization); nel 1963 le due organizzazioni hanno dato vita al Codex Alimentarius,

programma creato per sviluppare standard e linee guida orientate a proteggere la salute dei consumatori.

In Europa il concetto di sicurezza alimentare è diventato una priorità in tempi più recenti. La disponibilità di alimenti sicuri è stata ritenuta un diritto fondamentale nella Conferenza Internazionale sulla Nutrizione del 1992 e nel Summit Mondiale sull'Alimentazione del 1996, in quanto requisito fondamentale per la promozione e tutela della salute umana.

Nel Gennaio 2000 l'Unione Europea ha predisposto il Libro Bianco per la Sicurezza Alimentare, con 84 azioni prioritarie suddivise in 19 aree strategiche di intervento (contaminanti, salute animale, igiene, nuovi prodotti alimentari, pesticidi, nutrizione,...) per la protezione della salute del consumatore.

Con lo scopo di adottare un piano d'azione integrato, coniugante qualità e sicurezza nel rispetto delle produzioni tipiche, l'Europa ha costituito la European Food Safety Authority (EFSA) con sede a Parma, che con garanzia di indipendenza scientifica ha compiti di valutazione dei rischi correlati all'alimentazione, raccolta ed analisi di dati scientifici, valutazione di dossier prodotti dall'industria, identificazione di rischi emergenti e comunicazione del rischio.

L'interfaccia italiana dell'EFSA è il Comitato nazionale per la Sicurezza alimentare, nato dall'intesa tra Stato, Regioni e Province autonome il 17 Giugno 2004.

“The First Action Plan for Food Nutrition Policy 2000-2005” è un progetto dell'Unione Europea per lo sviluppo di una politica per l'alimentazione e la nutrizione in grado di proteggere e promuovere la salute, riducendo l'incidenza delle patologie a trasmissione alimentare.

Per garantire la sicurezza degli alimenti, a partire dal prodotto grezzo fino a quello che giunge sulla tavola del consumatore, sono state messe a punto nel tempo strategie e metodologie di prevenzione delle contaminazioni e di controllo della correttezza delle operazioni svolte dagli operatori del settore. I punti critici del rischio alimentare comprendono i processi di produzione degli alimenti, i protocolli e le procedure di controllo (tra cui LISA e HACCP), il rischio chimico in agricoltura e il

rischio microbiologico legato alle zoonosi (12) (16). Tra le procedure di controllo in tema di sicurezza alimentare rivestono una grande importanza l'autocontrollo e il sistema HACCP.

Per autocontrollo si intende l'obbligo di tenuta sotto controllo delle produzioni da parte degli operatori, e discende dal processo di responsabilizzazione dell'operatore del settore alimentare (OSA).

L'HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) è un sistema che consente di applicare l'autocontrollo in maniera razionale ed organizzata. E' obbligatorio per i settori post-primari. Il sistema HACCP rappresenta uno strumento teso ad aiutare gli OSA a conseguire un livello più elevato di sicurezza alimentare.

I principi su cui si basa l'elaborazione di un piano HACCP sono:

1. Identificare ogni pericolo da prevenire, eliminare o ridurre;
2. identificare i punti critici di controllo (Critical Control Points-CCP) nelle fasi in cui è possibile prevenire, eliminare o ridurre un rischio;
3. stabilire per questi punti critici di controllo i limiti critici che differenziano l'accettabilità dalla inaccettabilità;
4. stabilire e applicare misure di sorveglianza efficaci nei punti critici di controllo;
5. stabilire azioni correttive se un punto critico non risulta sotto controllo (superamento dei limiti critici stabiliti);
6. stabilire le procedure da applicare regolarmente per verificare l'effettivo funzionamento delle misure adottate;
7. predisporre documenti e registrazioni adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare (17) (18).

La prima codifica normativa in Europa risale al 1993 con la Direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il Decreto legislativo 26 Maggio 1997 n. 155, ora abrogato). Questa normativa è stata sostituita dal Regolamento CE 178/2002 e dal Regolamento CE 852/2004, e loro successive modifiche.

Data l'ampia gamma di imprese alimentari prese in considerazione dal Regolamento CE 852/2004 e la grande varietà di alimenti e procedure produttive, sono state redatte dalla Commissione europea delle Linee Guida generali sullo sviluppo e l'applicazione delle procedure basate sui principi del sistema HACCP; tali Linee Guida si ispirano ai principi del Codex Alimentarius e forniscono indicazioni su un'applicazione semplificata delle prescrizioni in materia di HACCP in particolare nelle piccole imprese alimentari (19).

Listeriosi

L'epidemiologia dell'infezione da *Listeria monocytogenes* è cambiata radicalmente in tutta Europa nel decennio tra il 2001-2012 rispetto ai dieci anni precedenti, sia per quanto riguarda l'incidenza, sia per quanto riguarda i soggetti colpiti, riguardando sempre di più individui ultrasessantenni (20). Questi cambiamenti non paiono essere artefatti correlati a modificazione dei sistemi di sorveglianza, così come non sembrano legati ad alterazioni avvenute nella popolazione per quanto riguarda età, sesso ed etnia, dunque è ipotizzabile che le profonde modificazioni nella diffusione e nella presentazione di questa infezione batterica siano dovute all'aumento della popolazione che presenta condizioni di immunodeficienza predisponenti o alla maggiore diffusione di comportamenti a rischio.

La listeriosi, secondo la definizione della WHO, è una malattia relativamente rara, diffusa soprattutto nei paesi industrializzati, forse per la maggiore presenza in aree di comportamenti alimentari a rischio, come il consumo di cibi *ready to eat* o forse per la carenza, nei paesi in via di sviluppo, di sistemi di sorveglianza specifici; sempre secondo la WHO si tratta di una patologia che, per quanto rara, desta preoccupazione per l'elevata letalità che la caratterizza.

I dati pubblicati nei rapporti WHO sul rischio di contrarre un'infezione da *L.monocytogenes* stimano che l'incidenza annuale della listeriosi umana nel mondo va da 0,1 a 11,3 casi per milioni di persone, con 0,3/7,8 casi per milione di persone in Europa (nel biennio 2001-2002) e tre casi per milioni in Australia. I dati del FoodNet, sistema di sorveglianza per le infezioni alimentari USA,

indicano che nel triennio (1996-1998) sono stati riportati annualmente 5 casi di listeriosi per un milione di abitanti. Secondo il CDC, nonostante la notifica obbligatoria della malattia, vengono registrati solitamente solo i casi acuti, che richiedono l'ospedalizzazione o l'attenzione medica, e che rappresenterebbero il 50% del totale, dato non del tutto negativo, considerando che per quanto riguarda le altre *foodborne* la percentuale d'identificazione è solo del 3%. In totale, quindi, secondo il CDC negli USA si ammalano di listeriosi circa 2500 persone all'anno e di queste 500 muoiono. Attente pratiche preventive e intense campagne informative sul tema della sicurezza alimentare hanno permesso, negli USA, di vedere una riduzione dell'incidenza della listeriosi da 7,9 per milione di abitanti a 4,4, nel quinquenni 1989-1993.

Successivamente con l'avvio del sistema di sorveglianza FoodNet si è osservata una ulteriore riduzione del 40% dal 1996 al 2002. Sembra secondo il WHO un simile trend di riduzione si è osservato anche in Europa in Gran Bretagna e in Australia. In Francia, le misure preventive, avrebbero ridotto del 68% l'incidenza di listeriosi nel decennio 1997-2007 (21). Questi dati tuttavia, sono in contrasto con quanto rilevato da numerosi e recenti studi sull'incidenza della patologia in Europa che ne hanno messo in luce un aumento a partire dal 2000 in numerosi stati: Danimarca, UK, Belgio, Francia (Tabella 1).

Tabella 1. Incidenza annuale (casi/10⁵ abitanti) di listeriosi in 8 stati europei

Stato	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Belgio	4.07	5.06	4.03	7.03	8.06	5.09	6.04
Danimarca	7.05	7.01	5.02	5.04	7.06	8.05	10.03
Gran Bretagna	1.09	2.08	2.06	4.05	4.00	3.05	3.05
Finlandia	3.05	5.04	3.08	7.09	6.07	6.08	8.05
Germania	0	2.06	2.09	3.01	3.06	6.02	6.02
Olanda	0	0	2	3	3	5.06	3.09
Svezia	5.09	7.05	4.04	5.03	4.07	4.04	4.06
Svizzera	0	5.01	3.08	6.01	7.08	9.08	9.01

Per quanto riguarda il caso francese, gli autori ipotizzano una relazione tra il programma di diminuzione in 5 anni del consumo di sale quotidiano rientrando a far parte della lotta contro l'ipertensione arteriosa e la conseguente riduzione del contenuto di sale negli alimenti di produzione

industriale con la conseguente formazione di un ambiente favorevole alla proliferazione di *L.monocytogenes* (22). Anche in ambito inglese si è cercato di spiegare questo aumento di casi, ma tutte le ipotesi teorizzate dagli autori, quali un cambiamento della popolazione, delle tecniche diagnostiche, delle misure di sorveglianza o del microrganismo vengono ritenute poco probabili, lasciando aperta la questione (23).

I casi registrati in Danimarca, la possibile eziologia dell'aumentata incidenza è stata correlata ad un aumento del consumo dei cibi *ready to eat*, ad un'aumentata prevalenza dei pazienti che sopravvivono a condizioni predisponenti o ad un cambiamento nella terapia antibiotica empirica della sepsi, che in Danimarca ha visto la soluzione dell'uso di penicillina o amino glicoside con l'utilizzo di una cefalosporina di terza generazione, a cui *Listeria monocytogenes* è resistente; tuttavia le ipotesi proposte recano con sé numerosi dubbi e quindi la problematica rimane aperta.

In ambito italiano, la listeriosi è da tempo oggetto di attenzione prioritaria, soprattutto al fine di acquisire una consapevolezza maggiore e realistica riguardo gli aspetti epidemiologici dell'infezione; a questo proposito dal 2002 al 2003 è stato attivato un sistema di sorveglianza attiva che coinvolge 40 laboratori localizzati in 10 regioni, affiancato al sistema delle notifiche obbligatorie. Questo studio ha raccolto 192 casi, con un'incidenza dell'1.3/1000000 abitanti/anno, che contrasta con il dato in mano al Ministero della Sanità derivante dalle notifiche obbligatorie, il quale, nello stesso intervallo di tempo, ha stimato un'incidenza di $0,8/10^5$ /anno (24).

Per quanto riguarda i dati ufficiali dell'epidemiologia della listeriosi in Europa, il bollettino annuale delle patologie trasmissibili steso nel 2010 dall'ECDC (25) ha rilevato 1472 casi nel 2008, con un'incidenza di 0.31 casi per 100000 abitanti nell'UE, dato inferiore rispetto all'equivalente dell'anno precedente ($0.35/10^5$). I paesi con la maggior incidenza di notifiche sono risultati l'Islanda ($1,3/10^5$), la Danimarca ($1,1/10^5$), la Norvegia ($1,1/10^5$), la Finlandia ($0,75/10^5$) e la Svezia ($0,60/10^5$), a causa del consumo di pesce affumicato superiore a quello che si ha nel resto del continente, mentre Cipro, Malta e la Romania hanno rilevato 0 casi; solo il Portogallo non ha riportato dati.

Solo 13 casi degli 862 in cui erano disponibili i dati riguardanti la sede d'infezione sono risultati acquisiti all'estero. Il 56% dei casi interessa individui di oltre 65 anni e questa fascia d'età rappresenta quella con il maggior tasso di notifica ($0,95/10^5$), seguita dalla fascia dei bambini sotto i 5 anni ($0,35/10^5$). Il rapporto maschio-femmina è di 1,28, ma mostra una importante variabilità a seconda della fascia d'età: fra gli anziani sono più colpiti gli uomini, mentre nelle fasce d'età più giovani la patologia colpisce di più le donne, a causa della maggior attenzione posta alla listeriosi quando si tratta di donne in età fertile e in gravidanza, in particolare tra i 25 e i 44 anni.

Per quanto riguarda la stagionalità, è stato riscontrato un trend stagionale con un aumento di casi in estate e l'inizio dell'autunno; gli alimenti più coinvolti sono salmone affumicato, carne e formaggi (25).

Nell'ambito epidemiologico, uno studio inglese ha esaminato la relazione tra listeriosi e condizioni socio-economiche, concludendo che il rischio relativo di contrarre la patologia è maggiore e in aumento (4,33 nel 2008) tra le minoranze etniche, a causa delle differenti abitudini alimentari tra le diverse etnie residenti nel Regno Unito fatto a cui si aggiunge la maggior prevalenza di situazioni di deprivazione socio economica e una minore possibilità di accedere ai servizi sanitari tra i nuclei di immigrazione (26).

Il pattern d'incidenza della listeriosi assume spesso un andamento epidemico in seguito all'ingestione da parte di un gruppo di popolazione di un alimento contaminato, con un tasso d'attacco variabile e un numero di decessi che riguarda generalmente individui con fattori di rischio. L'alimento implicato è variabile come, del resto, l'area geografica ed il microambiente (domestico, industriale, ospedaliero) (10).

Nel 2002, negli USA, un'epidemia di listeriosi associata al consumo di carne di tacchino contaminata ha causato 54 casi di malattia, 8 decessi e 3 morti endouterine fetali in 9 casi differenti, mentre in Europa gli episodi epidemici sembrano essere correlati principalmente dall'assunzione di prodotti caseari: si sono verificate epidemie ne 1983 e 1987 in Svizzera, aventi come veicolo di contagio formaggi molli non pastorizzati, nel 1986 in Austria per il consumo di latte non

pastorizzato, e nel 1995 in Francia, dove un tipo di Brie, sempre a base di latte non pastorizzato, è stato all'origine di un'epidemia. Sempre riguardo i latticini, già da tempo è nota l'associazione fra la listeriosi e il consumo di un particolare tipo di formaggio a pasta molle ottenuto da latte non pastorizzato, molto amato e consumato dalle popolazioni ispaniche anche quando emigrati in altri Paesi. Occorre ricordare un'epidemia causata da questo prodotto, che ha causato 142 casi di listeriosi negli USA nel periodo tra gennaio e agosto 1988 (27).

Tuttavia, anche prodotti pastorizzati e contaminati in seguito al trattamento termico hanno dato origine a casi di listeriosi, come è successo in Finlandia nel 1998-1999 a causa del consumo di burro contaminato. Naturalmente non mancano esempi di episodi epidemici causati dal consumo di *delicatessen*: verso la fine di dicembre 1999, in Francia sono stati registrati 26 casi di listeriosi, con 7 morti, associati a un prodotto di gastronomia, lingua di maiale in gelatina e nel 2002 si sono registrati 211 casi in cui 197 sporadici associati a due cluster di 11 e 3 casi legati al consumo di salumi e patè. In Italia (1997) un'epidemia di listeriosi gastroenterica derivata da insalata di mais e tonno contaminato, ha coinvolto oltre 1500 persone, di cui oltre 300 sono state ospedalizzate; nella maggior parte dei casi si trattava di bambini e del personale di due scuole elementari di Torino, mentre altri casi si sono manifestati tra studenti dell'Università della stessa città. tutte le persone colpite dall'infezione avevano mangiato presso 2 caffetterie servite dallo stesso sistema di catering; una analisi del DNA nei ceppi di *Listeria* isolati dai pazienti e nelle porzioni d'insalata ha confermato l'origine dell'infezione (12).

I dati riportati fanno riferimento esclusivamente a realtà occidentali, USA, Canada, Europa, Australia, mentre mancano informazioni epidemiologiche sulla listeriosi nei paesi asiatici, dell'America Latina e Africani, a causa del diverso aspetto delle reti di sorveglianza in queste aree. E' stato pubblicato uno studio sugli aspetti epidemiologici di *L.monocytogenes* in Taiwan, che riporta i dati raccolti in 13 anni di osservazione (1996-2008) presso un grande ospedale che non può essere rappresentativo di un intero paese; i risultati ottenuti hanno rivelato un aumento dell'incidenza di listeriosi a partire dal 2005, con il passaggio da un'incidenza annua di

0,0287casi/1000ricoveri ad una di 0,118casi/1000ricoveri. Gli autori sottolineano la grave mancanza di un sistema di sorveglianza su scala nazionale, affiancato ad un deficit nella rete di controllo della sicurezza alimentare, problematiche che si riproducono in modo analogo in molti degli stati di cui la documentazione sulla listeriosi è carente (28).

Vie di trasmissione

La via principale di trasmissione è quella per via alimentare, alla quale fa seguito un eventuale contagio verticale se la donna è in gravidanza.

Il contagio è legato alla presenza di condizioni che permettono la replicazione del m.o. che dipende dalla sicurezza degli alimenti a livello industriale, dall'uso a cui il prodotto è destinato e dall'adozione di norme igieniche basilari (9).

Gli alimenti più coinvolti sono: ready-to-eat, cibi crudi o precotti, prodotti di gastronomia. A seconda delle abitudini alimentari di un certo Paese i cibi implicati possono essere differenti: in Francia i formaggi e il patè, nei paesi arabi la crema di ceci e sesamo, in USA hotdog e delicatessen, mentre in Asia i prodotti ittici, in particolare salmone e frutti di mare. Largamente implicati troviamo: gelati, cioccolato, formaggi a pasta molle da latte non pastorizzato o con venatura blu e, infine, prodotti vegetali di vario genere sia freschi che surgelati (9).

Patogenesi

La patogenesi della listeriosi è poco conosciuta sia negli animale sia negli umani e le informazioni disponibili sono derivate dall'interpretazione di dati epidemiologici, clinici e istopatologici riguardanti modelli murini.

L'infezione inizia con l'ingestione di un alimento contaminato con una dose variabile di *L.monocytogenes*, che giunge a livello gastrico dove, se il microrganismo è presente in qualità elevate o se la barriera acida è deficitaria per patologie preesistenti (colonizzazione da parte *Helicobacter pilori*, gastrite atrofica, ...) o per l'utilizzo di farmaci (idrogeno antagonisti, inibitori di

pompa,...) riesce a sopravvivere e raggiungere l'intestino. A questo livello *L.monocytogenes* invade sia le cellule epiteliali, sia le cellule immunitarie del tessuto linfoide associato alle mucose (MALT), senza essere andato incontro ad una replicazione nel lume. Gli studi murinici hanno messo in luce come anche le specie di *Listeria* non patogene e quelle in cui i geni codificanti i principali fattori di virulenza sono stati silenziati, abbiano la capacità di penetrare nelle cellule dell'intestino, dimostrando come la traslocazione batterica sia un evento passivo e aspecifico, correlato alla dose. Una volta penetrato nelle cellule il microrganismo dotato di emolisine inizia il suo processo replicativo, che avviene nelle cellule immunitarie costituenti le placche di Peyer, e a cui fa seguito la diffusione cellula/cellula, dall'altra dà luogo ad una risposta che porta alla formazione di una memoria immunologica, la quale rappresenta un ruolo nella resistenza a infezioni successive e che è responsabile della formazione di lesioni piogranulomatose subepiteliali, in cui si identificano all'osservazione microscopica le cellule batteriche contenute nei mononucleati residenti permissivi, cellule dendritiche o macrofagi non attivi. Queste lesioni sono identificabili solo quando la dose infettante è importante e alla prima fase di colonizzazione e penetrazione quando corrisponde una gastroenterite febbrile.

L'evento successivo nella patogenesi è la localizzazione tramite il flusso ematico portale o il trasporto da parte di cellule dell'immunità a livello epatico, linfonodale e splenico; il 90% dei batteri si accumula nel fegato internalizzati dalle cellule di Kupffer, che permettono lo sviluppo di una risposta immunitaria specifica con la proliferazione di linfociti T, la liberazione di citochine proinfiammatorie ed il conseguente reclutamento di neutrofilo; le cellule batteriche che sopravvivono al killing macrofagico iniziano a replicarsi e diffondono da un epatocita all'altro, coinvolgendo il parenchima epatico. Se l'immunità cellulo-mediata è attiva e efficiente, si formano granulomi, che contengono l'infezione e portano alla guarigione, nel caso di pazienti immunodeficienti il microrganismo prolifera in modo incontrollato e questo processo esita nel suo riversamento in circolo. *Listeria m* è un patogeno capace di infettare diversi tipi di tessuti e organi,

localizzandosi a livello del sistema nervoso centrale e nell'utero gravido, ma potendo anche dare luogo ad un quadro setticemico.

L'infezione verticale, *L.monocytogenes* è in grado di passare la barriera placentare, invadendo la decidua basale e i villi, dove dà luogo ad un infiltrato infiammatorio diffuso ed ad aree di necrosi, che istologicamente appaiono come microascessi diffusi e foci di villosità necrotizzante. La colonizzazione del trofoblasto determina il riversamento del microrganismo nel ciclo fetale con un quadro settico con esiti diversi a seconda dell'età gestazionale.

Clinica

La listeriosi si manifesta principalmente in due forme: una forma grave, invasiva che interessa specifici gruppi di popolazione predisposta, ed una forma non invasiva con sintomi gastrointestinali e lieve febbre che può colpire individui sani.

-Forme materno-fetali

L'incidenza di listeriosi nelle gestanti risulta 17 volte maggiore che nella popolazione generale; la gravidanza è una condizione che predispone ad un'infezione da *L.monocytogenes* trasmessa con l'ingestione di cibo contaminato. In vari studi i casi materno-infantili risultano un terzo del totale (29). Durante la gravidanza, la soppressione dell'immunità cellulo- mediata che permette la crescita e la sopravvivenza del feto geneticamente non-self rende la donna suscettibile all'infezione da *L.monocytogenes* che riesce a superare così la barriera gastrointestinale. La patologia è meglio documentata durante il terzo trimestre di gravidanza probabilmente per il maggior declino dell'immunità cellulo-mediata che avviene dalla ventiseiesima settimana a circa la trentesima settimana di gestazione (30)), ma non si escludono casi nel corso di settimane precedenti (31).

L.monocytogenes possiede un particolare tropismo per il tessuto placentare e l'infezione del feto può causare morte intrauterina, aborto settico, parto prematuro, listeriosi neonatale ad insorgenza precoce o tardiva.

Approssimativamente il 29% delle listeriosi perinatali esita con la morte del feto: aborto (6%), morti intrauterine (12%) o morti neonatali (11%), circa il 20% è causa di parto prematuro (32). Tutte le madri sopravvivono; solo l'1,6% delle donne, di cui la gravidanza termina con un aborto o come parti pre-termine, ha avuto una infezione da *L.monocytogenes* documentata (33). Nei due terzi dei casi, la sintomatologia materna è completamente aspecifica: consiste in sintomi similinfluenzali (flu-like) con febbre solitamente intorno ai 38°C, cefalea e mialgia. Meno di frequente si verificano veri e propri sintomi gastrointestinali con diarrea e crampi addominali, e più raramente, se l'infezione ha interessato il tratto urinario, dolori alla minzione (34). Questo quadro difficilmente definibile consiste nella fase batteremica e rappresenta il momento in cui la placenta viene infettata. Storia di aborti ricorrenti dovuta a *L. monocytogenes* non sono state documentate. La listeriosi non trattata può non essere letale, ma certamente un trattamento specifico e mirato effettuato nella madre aumenta la probabilità di portare a nascita un neonato sano (35).

Il target di invasione placentare sono principalmente le cellule del trofoblasto che ricoprono il lume dei vasi che penetrano fino alla decidua basale materna. Il batterio invade queste cellule e le strutture ad esse connesse, ma una grande quantità continua a ricircolare aumentando le probabilità di infezione per tutta la barriera materno-fetale. Il passaggio del sincizio trofoblasto segna l'inizio dell'infezione fetale (36). Come conseguenza di una massiva infezione della zona del labirinto, i vasi fetali stimolati dall'infezione possono produrre sostanze procoagulanti trombotiche. La trombosi ischemica è infatti una delle cause di aborto nei feti infetti da *L. monocytogenes* (37). Il microrganismo in questa fase è presente nel sangue nel 50% dei casi, nelle secrezioni vaginali nel 34%, nella placenta nel 12%, nel fluido amniotico nell'8% e nelle urine in solo il 2%. La progressione in amniosite esita nel giro di 3-7 giorni in morte intrauterina e aborto settico nel 20% dei casi e la probabilità di trasmissione al bambino è molto elevata.

L'istologia della placenta mostra macroascessi parenchimali di varia grandezza; questi noduli solidi, ben delineati, di colore bianco-grigiastro, possono però risultare indistinguibili da infarti placentari

di origine ischemica, villite acuta o esiti di una infiammazione acuta. *L.monocytogenes* deve quindi essere ricercata nel materiale ascessuale tramite metodologia ad impregnazione argenticca (38).

Per motivi non ancora risolti l'infezione della donna a livello del sistema nervoso centrale durante la gravidanza è un evento estremamente raro in assenza di altri fattori di rischio.

All'infezione in utero segue la forma neonatale. Studi mondiali dimostrano un interessamento neonatale da 0.6 a 4.1 casi su 104 nati vivi (39). La forma neonatale precoce è la più frequente e si manifesta nel 45-70% dei casi di listeriosi materno-infantile. In questi casi spesso la madre ha presentato qualche giorno prima del parto una sintomatologia flu-like, compatibile con la fase di batteriemia sistemica che porta all'infezione uterina del prodotto del concepimento. Inoltre, la forma precoce può presentarsi anche sotto forma di parto pretermine .

Clinicamente il neonato con listeriosi si presenta già alla nascita o entro la prima settimana di vita, con segni di distress respiratorio, liquido amniotico tinto di meconio alla nascita, febbre, letargia, e rash cutaneo maculopapulare e papulovesicolare al tronco e agli arti (40).

L'elevata concentrazione di *L. monocytogenes* trovata nei polmoni e nell'intestino suggerisce che l'infezione può inoltre essere acquisita in utero per via inalatoria e per ingestione di liquido amniotico infetto oltre che per via ematogena. La stima della letalità nei bambini con listeriosi a manifestazione precoce è di circa il 25-46%. La sintomatologia insorge come detto circa dopo 24-48 ore dopo il parto, con un quadro da sindrome settica a cui si possono aggiungere altre manifestazioni dell'infezione come la polmonite, meningite o miocardite.

La granulomatosi settica è il quadro di listeriosi più grave in cui le lesioni di tipo ascessuale di origine infiammatoria, sono ampiamente disseminate in vari tessuti; oltre ad essere comunemente presenti nel fegato, nella cute, nella placenta, si presentano nel cervello, nel surrene, nella milza, nel rene, nel polmone e nell'apparato gastrointestinale. L'aspirazione di liquido infetto peggiora certamente l'insufficienza respiratoria e l'equilibrio emodinamico già instabile del neonato. La mortalità è molto elevata . L'emocoltura è il metodo migliore di indagine in questi bambini che in molti studi ha mostrato una positività prossima al 100% dei casi (40), ma data l'ingente

disseminazione del patogeno anche tamponi cutanei, faringei, congiuntivali e prelievi di liquido cerebrospinale possono con probabilità inferiori, risultare un ausilio diagnostico.

La forma di listeriosi neonatale tardiva è meno frequente rispetto alla manifestazione precoce (circa 14%). E' maggiormente caratteristica dei parti non complicati di neonati apparentemente sani. Il neonato alla nascita è in buono stato di salute e nell'anamnesi materna non ci sono elementi che possano fare sospettare una avvenuta infezione. La prima manifestazione compare alcuni giorni o settimane dopo la nascita (il tempo medio di comparsa dei sintomi è di 14 giorni). La clinica in questo caso mostra segni e i sintomi di un quadro di meningite, all'inizio possono essere molto sfumati come febbre, irritabilità, anoressia, diarrea e letargia e successivamente mostrare segni di rigidità meningea, stato saporoso fino al coma.

L. monocytogenes è uno dei tre maggiori microrganismi che causano meningite nel neonato. Le manifestazioni cliniche possono essere simili a quelle associate alla meningite da streptococco di gruppo B. L'infezione, nelle forme tardive di listeriosi neonatale, può secondo alcuni studi essere dovuta ad una infezione non intrauterina, ma avvenuta durante il passaggio del bambino dal canale del parto; la ricerca del patogeno però risulta raramente positiva da tamponi vaginali o rettali della madre.

La forma di listeriosi a manifestazione tardiva è meno grave rispetto a quella precoce, ma la letalità rimane comunque del 15-20% raggiungendo secondo alcuni autori il 30% (41). Si è visto che nelle forme tardive il sierotipo maggiormente implicato sia il 4b.

-Forme non materno infantili

Le forme d'infezione provocate da *L. monocytogenes* in soggetti non legati alla gravidanza possono essere distinte in due gruppi principali a seconda dello stato di salute del soggetto infettato e della manifestazione clinica che provoca l'infezione in: forme invasive e gastroenteriti febbrili.

1. Forme invasive. L'incidenza della listeriosi non materno-infantile aumenta in modo proporzionale con l'età del paziente, con un incremento dopo i 60 anni, ed è inoltre strettamente correlata ad una deficienza dello stato immunitario. Altri fattori di rischio includono le terapie corticosteroidi o con

altri farmaci immunosoppressivi (31% degli adulti infetti), neoplasie e terapie correlate (27% degli adulti infetti), infezione da HIV, diabete, insufficienza renale, insufficienza cardiaca di tipo congestizio, trapianti d'organo, cirrosi epatica alcool e non alcool correlata, alcolismo, malattie autoimmuni, sovraccarico di ferro da emocromatosi, carenze nella secrezione di acido gastrico dovute sia a patologie di base che a cause iatrogene, come resezioni gastriche o trattamenti con antiacidi quali antagonisti H₂ o inibitori di pompa (42). L'incidenza di listeriosi tra pazienti HIV-infetti e pazienti con AIDS è compresa tra 52 e 115 casi su 100.000 pazienti. Si sono osservati casi di listeriosi in pazienti che facevano uso di droga iniettata per via intravenosa tagliata con erbe o terra contaminata (43).

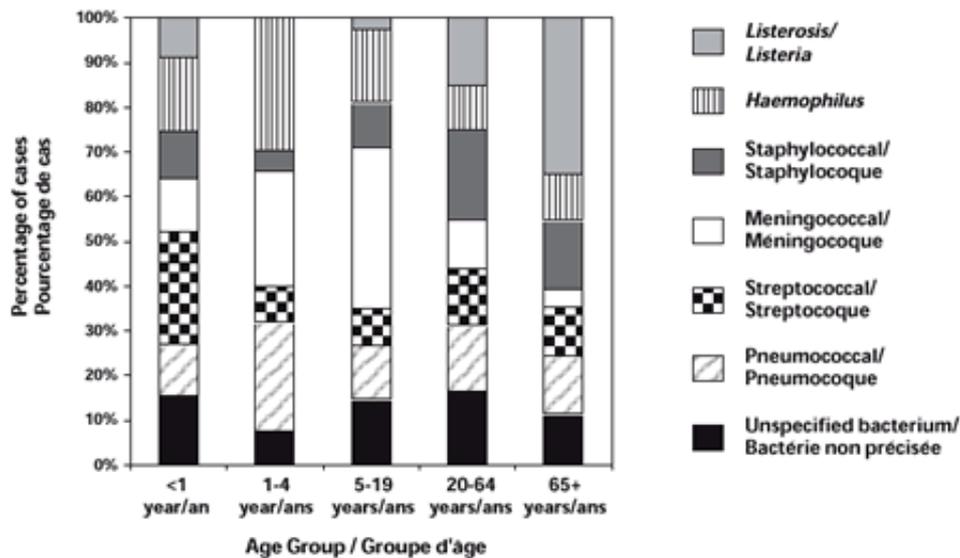
I fattori di rischio locali sono quelli già menzionati che producono lacerazioni alla mucosa intestinale annientando la sua funzione di barriera (42).

Il batterio mostra un notevole tropismo per il tessuto nervoso, è capace infatti di superare la barriera sangue-SNC, sia invadendo direttamente le cellule endoteliali dei vasi e successivamente la microglia e le cellule neuronali, sia utilizzando i monociti parassitari come carriers, ed ancora utilizzando la via neuronale in senso centripeto, a partire da lesioni periferiche.

La listeriosi non materno-infantile si manifesta tipicamente con meningite o setticemia (43). Dopo il periodo neonatale, il 50 per cento dei pazienti con listeriosi manifestano meningite.

La *Listeria* è seconda solo allo *Streptococcus pneumoniae* come agente eziologico di meningite negli adulti sopra i 50 anni ed è la maggiore causa di meningite in pazienti con linfoma in terapia (a causa del basso livello di linfociti), in pazienti trapiantati, in pazienti sottoposti a terapia corticosteroidica e in soggetti anziani sopra i 65 anni di età (44).

Figura 3. Distribuzione delle meningiti batteriche per gruppi di età.



I sintomi classici con cui si presenta la meningite sono febbre, vomito, segni di interessamento meningeo, alterazioni dello stato di coscienza, tremore. Possono inoltre comparire deficit multipli dei nervi cranici, particolarmente del sesto e del settimo, emiparesi, atassia e anomalie respiratorie che possono portare ad arresto ventilatorio. Nel 39% dei casi, quando l'infezione è molto estesa, si producono crisi epilettiche con tremore e deficit motori. Altri deficit appaiono solitamente intorno al quarto giorno dall'inizio dei sintomi e il 30% dei pazienti esita con sequele neurologiche.

Negli adulti, una forma particolare di encefalite che coinvolge il romboencefalo risulta simile alla zoonosi che produce movimenti circolari continui nell'animale. La risonanza magnetica mostra bene in questi casi l'infezione a livello del romboencefalo; meningoencefalite, encefalite, ascessi cerebrali e ascessi spinali sono più rari.

L'analisi del liquido cefalorachidiano riflette spesso la natura intracellulare dell'infezione; a differenza delle meningiti di altra eziologia batterica, quella causata da *L.monocytogenes* può presentare nel liquor basse concentrazioni di neutrofili e nel caso di meningoencefalite la quasi totalità di cellule presenti alla conta (dall'80% al 90%) possono essere mononucleate (pleiocitosi con globuli bianchi >di 5 per mm³) (45). La ricerca del patogeno con la metodica di Gram in un liquor a prevalenza monocitosico può dare esito negativo in più del 50% dei casi.

Nei pazienti immunocompromessi possono comparire anche lesioni focali come risultato di un focolaio infiltratosi in una particolare sede durante la fase batteriemia iniziale, come endoftalmiti, artriti settiche, osteomieliti, ascessi epatici o splenici, colecistiti, peritoniti, infezioni pleuropolmonari, miocarditi, pericarditi, arteriti, congiuntiviti e infezioni cutanee.

L'endocardite interessa soprattutto pazienti con sottostanti lesioni cardiache come anomalie valvolari o protesi, ma è clinicamente indistinguibile dalle altre cause di endocardite. Sono riportati in letteratura anche casi di peritonite batterica spontanea (SBP) con liquido ascitico positivo *per L. monocytogenes* in pazienti affetti da cirrosi epatica (46).

L'associazione con complicanze settiche gravi è molto frequente e la letalità è del 48%; sono state osservate endocarditi, artriti settiche e osteomieliti da *Listeria* (45).

La presentazione più frequente dell'infezione da *L.monocytogenes* in pazienti immunocompromessi è invece la batteriemia senza il riscontro di un focolaio localizzato. Le complicanze possono consistere in coagulazione intravascolare disseminata (DIC), sindrome da stress respiratorio o in insufficienza renale acuta. Casi di reinfezione sono rari.

2. Gastroenterite febbrile. Circa il 6-10% della popolazione è portatore sano di *L. monocytogenes* nelle feci (43).

Una manifestazione clinica di listeriosi evidenziata negli ultimi anni è la gastroenterite febbrile. Molto si conosce riguardo alle forme invasive che spesso sono precedute da sintomi gastrointestinali prodromici, ma ancora è poco considerato nella pratica clinica il fatto che anche la *L. monocytogenes* sia tra le cause di gastroenterite febbrile non complicata (47).

La listeriosi si differenzia dalle altre patologie foodborne nelle quali la sintomatologia gastroenterica non sistemica è ben definita.

Dai dati prodotti dopo alcune epidemie di gastroenterite, una delle quali ha coinvolto in Italia nel 1997 più di 1500 persone, si è potuto delineare meglio le caratteristiche di questo quadro patologico. Questa forma gastroenterica si presenta nei soggetti immunocompetenti con sintomi

simil-influenzali (88%), dolore addominale (72%) e febbre (68%); l'incubazione media è di circa 24 ore. Il tasso di ospedalizzazione è del 20% (48).

Il 65% delle epidemie *food-borne related* riportate ai CDC (Centres for Disease Control and Prevention) con un periodo di incubazione maggiore di 6 ore rimane ancora oggi giorno senza l'identificazione del fattore eziologico; testare anche per la *L.monocytogenes* i campioni fecali raccolti in queste epidemie potrebbe sostanzialmente incrementare il numero di gastroenteriti febbrili da *Listeria* identificate. I sierotipi implicati sono quasi esclusivamente il sierotipo 1/2 e il 4b.

Tabella 2. Rischio Relativo per differenti sub-popolazioni (WHO/FAO, 2004) e su uno studio di H. Hof, Immunology and Medical Microbiology, 2003.

Condizione	RR (WHO/FAO)	RR (H.Hof)
Trapianto	2584	143
Neoplasia ematica/linfatica	1364	1429
AIDS	865	857
Dialisi	476	-
Cancro gastrointestinale o epatico	211	21
Patologia epatica non-neoplastica	143	-
Diabete insulino-dipendente	30	-
Alcolismo	18	7
Età > 65 anni	7.5	3
Età < 65 anni e nessuna condizione associata	0	1

Diagnosi

La diagnosi di listeriosi passa attraverso l'isolamento del batterio dai materiali biologici fisiologicamente sterili, quali il sangue e il liquor e, nei casi materno infantili, il liquido amniotico, gli annessi fetali e i tamponi superficiali alla nascita (49).

Il riscontro di *L. monocytogenes* nelle feci e nel tratto genitale non è diagnostico, poiché la percentuale di portatori asintomatici è elevata la possibilità di porre diagnosi mediante tecniche

sierologiche (sierotipizzazione) è ormai poco significativa per la frequente presenza di antigeni comuni a differenti batteri (50). Le metodologie sierologiche assumono importanza nell'affiancare le più moderne tecniche di biologia molecolare nel riconoscere cluster epidemici o ceppi particolarmente patogeni.

La diagnosi molecolare è inoltre molto utile per identificare il veicolo alimentare dell'infezione senza alcun dubbio o incertezza. La biologia molecolare ci aiuta anche a discernere i casi sporadici da quelli epidemici e a creare un linguaggio comune tra laboratori garantendo l'identificazione di epidemie su larga scala, anche internazionale. La tecnica più utilizzata e considerata il Gold-standard è la PFGE (PulseField-Gel Electrophoresis), che rappresenta una tecnica di elettroforesi capace di analizzare l'intero genoma del batterio in analisi grazie al costante cambiamento della direzione del campo elettrico durante la corsa. Questo permette di ottenere la tipizzazione in base al DNA dell'organismo con grande sensibilità rispetto alle tecniche microbiologiche (51).

Terapia

Non esistono attualmente trials controllati che stabiliscano la terapia adeguata per le varie forme di listeriosi.

Nell'animale il trattamento è iniziato troppo tardi a causa dell'assenza frequente di sintomi, della mancata diagnosi o del breve decorso della malattia sistemica. Nell'uomo adulto la diagnosi di listeriosi è possibile attraverso l'isolamento di *L. monocytogenes* da siti normalmente sterili del corpo: sangue o il liquido cefalorachidiano sono i tessuti utilizzati più frequentemente.

Sebbene il trattamento della listeriosi sia nell'uomo come nell'animale sia difficile e spesso poco efficace, molte varietà patogene di *Listeria* siano suscettibili ad antibiotici quali l'ampicillina, l'amoxicillina e la penicillina G, mentre la resistenza alle cefalosporine è molto diffusa (52).

In relazione alla localizzazione intracellulare del patogeno e della formazione di granulomi, il trattamento solitamente consiste nella somministrazione di ampicillina prolungato per 3-6

settimane, associando empiricamente un aminoglicoside come la gentamicina. La stessa terapia è somministrata alle donne in gravidanza.

Nei rari casi di peritonite batterica spontanea in paziente affetti da cirrosi è bene che *L. monocytogenes* venga riconosciuta per impostare la terapia con ampicillina piuttosto che con cefalosporine di terza generazione a cui risulta meno sensibile (53).

Pazienti allergici alla penicillina e senza coinvolgimento endocardio possono assumere trimetropin-sulfametossazolo da solo. Gli esiti della terapia possono non essere soddisfacenti sia per la bassa risposta del paziente che per la persistenza dell'infezione dopo il termine della terapia. Nel soggetto sano con forma di gastroenterite febbrile non è prevista alcuna terapia. I CDC non raccomandano la profilassi antibiotica o test di laboratorio nemmeno per le persone definite ad alto rischio se non presentano sintomi compatibili sebbene alcuni studiosi ritengano che sia una posizione rivedibile poiché nel soggetto immunocompromesso è fondamentale prevenire la forma invasiva. A causa dell'alto tasso di insuccesso della terapia, la prevenzione rimane come sempre la migliore strada per ridurre la morbilità e la mortalità di questa malattia.

Prevenzione

La prevenzione della listeriosi, date le caratteristiche epidemiologiche, richiede sia interventi da parte del mondo produttivo sia di grande attenzione da parte delle sanità pubbliche, soprattutto in termini di sorveglianza. Gli Stati Uniti mantengono tuttora la politica di “tolleranza zero” per *L. monocytogenes*, iniziata negli anni '90, cioè zero isolamenti di *Listeria m.* da due campioni di 25g ciascuno; molti Paesi Europei hanno stabilito limiti di rischio standard di presenza del microrganismo negli alimenti, soprattutto per i cibi *ready to eat* (meno di 100 cellule/g al momento del consumo). Inoltre i sistemi di controllo devono andare di pari passo con l'educazione di coloro che lavorano nel campo alimentare sia a livello della produzione sia a livello della distribuzione (9). Nonostante queste misure l'incidenza di listeriosi continua a restare pressoché invariata a dimostrazione che le misure di prevenzione devono essere incrementate. Inoltre, la crescita sempre

maggiore di una popolazione ad alto rischio comprendente le categorie degli anziani, dei malati di AIDS e di soggetti in terapia immuno-depressiva, ad esempio in seguito a trapianti, sono dei fenomeni che pongono certamente la listeriosi come un problema di salute pubblica anche futuro.

Per ridurre l'incidenza di listeriosi è necessario il controllo della contaminazione in ogni stadio del processo produttivo degli alimenti, iniziando dagli allevamenti e dalle coltivazioni. La listeriosi animale può essere ridotta eliminando i fattori di rischio conosciuti come il sovraffollamento eccessivo negli allevamenti e monitorando la qualità degli insilati. La Food and Drug Administration (FDA) ha pubblicato un documento contenente un possibile approccio sistematico per valutare scientificamente l'entità del problema listeriosi umana. Questo disegno valuta l'efficacia dei programmi e delle normative attualmente in uso per sorvegliare la presenza di *L. monocytogenes* e individua inoltre le aree più carenti che necessitano di ulteriori approfondimenti (54). Gli ambienti di trasformazione-preparazione degli alimenti sono stati riconosciuti come i punti cruciali a maggiore rischio di contaminazione, dove intervenire con miglioramenti nella organizzazione del lavoro, con procedure operative di sanificazione standardizzata, e con un maggiore utilizzo di programmi di analisi e controllo dei rischi Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP), tenendo presente la possibilità di persistenza di *Listeria monocytogenes* all'interno degli ambienti di manipolazione e confezionamento degli alimenti, e le dinamiche di trasmissione del microrganismo da questi al prodotto finito.

I continui sviluppi dei sistemi di sorveglianza come FoodNet (Centre for Disease Control and Prevention's Foodborne Disease Active Surveillance Network) sono ottimi strumenti per monitorare attivamente l'impatto della *Listeria* sulla salute pubblica, le caratteristiche della malattia, e permettere di controllare questa foodborne disease. Il controllo alimentare si presenta, quindi, come una componente fondamentale della prevenzione della listeriosi in tutte le sue forme e nei Paesi industrializzati sono in atto controlli specifici per la prevenzione della patologia. Il tasso di incidenza della listeriosi può inoltre essere ridotto grazie a programmi di educazione alimentare, indirizzati maggiormente alle categorie di popolazione ad alto rischio, che permettano di evitare il

consumo di alimenti con alta probabilità di contaminazione; particolare attenzione, a livello educativo, va dedicata alle donne in gravidanza.

Per tutti i consumatori la FDA e il FSIS hanno divulgato avvisi e consigli:

- informarsi sempre se il cibo è precotto o *ready to eat*;
- pulire il refrigeratore regolarmente;
- monitorare regolarmente la temperatura del refrigeratore.

Per le categorie a rischio sono indicati i cibi da evitare quali *ready to eat*, formaggi freschi e quelli che possono essere mangiati come formaggi a pasta semi molle come la mozzarella, e nei quali sia garantito il processo di pastorizzazione, formaggi stagionati.

Evitare pesce conservato, e meno che non sia possibile una cottura prima del consumo. Non bere latte fresco non pastorizzato o mangiare cibo che lo contiene. Regole generali in cucina: lavarsi le mani e le superfici di lavoro, separare le diverse tipologie di cibo (verdure dalla carne) per evitare cross-contaminazioni, cuocere a temperature adatte, surgelare i cibi immediatamente.

Prognosi

La listeriosi invasiva è la più letale fra le infezioni batteriche conosciute (55), con una letalità globale compresa tra il 20 e il 30%, e strettamente correlata allo stato di salute del paziente, per cui gli individui immunocompetenti e senza fattori di rischio, generalmente hanno una prognosi positiva, mentre fra gli individui immunodepressi la letalità si aggira intorno al 30-40%.

Nel 2010 l'ECDC ha pubblicato un bollettino da cui si evince che il 20.5% dei pazienti di cui è noto l'outcome è deceduto (25), mentre il CDC ha messo in evidenza nei rapporti FoodNet che *Listeria m.* è il patogeno alimentare con più alto tasso di ospedalizzazione (90.5% dei casi) e al secondo posto come letalità (21%). Anche secondo i dati WHO, la letalità associata alla listeriosi è elevata e si aggira intorno al 20-30% tra i pazienti ospedalizzati. Nei casi che non portano a decesso, la presenza di relinqui dipende dalla forma clinica contratta e dall'adeguatezza ed efficacia terapeutica, con una minore incidenza nei casi con coinvolgimento cerebrale e nei neonati (56).

Sorveglianza alimentare ed epidemiologica.

I cambiamenti nelle modalità di produzione, distribuzione e conservazione degli alimenti hanno creato il potenziale per la diffusione e l'insorgenza di epidemie. La scoperta di contaminazione in cibi crudi o *ready to eat* ha causato numerosi ritiri dal mercato con ingenti perdite economiche per le stesse industrie alimentari oltre a timori per la salute. Gli standard di sicurezza europei devono ancora definire modalità di controllo per la contaminazione della *Listeria* nei ready-to-eat food. Strumenti necessari sono indiscutibilmente la collaborazione internazionale, con la formazione di un database comune riguardante tutti i dati sulle analisi epidemiologiche svolte finora in ogni paese e soprattutto la standardizzazione delle metodologie di indagine microbiologica utilizzate in modo da ottenere risultati omogenei e utilizzabili ovunque.

I Paesi che hanno incrementato l'attività di sorveglianza, hanno definito le caratteristiche del problema e hanno attivato una collaborazione attiva tra sanità pubblica, sistemi di controllo alimentari e industrie alimentari, riuscendo a ridurre i livelli di contaminazione dei prodotti commercializzati (57). In Francia e USA la riduzione dell'incidenza è attribuibile a programmi di controllo per l'industria alimentare: Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) e a specifiche raccomandazioni a gruppi ad alto rischio. Inoltre la sierotipizzazione e la tipizzazione molecolare con PFGE, effettuata di routine in Francia e Finlandia, dimostrano cluster di casi associati ed epidemie con una comune causa alimentare. L'importanza della tipizzazione molecolare di routine effettuata su isolati provenienti da epidemie è stata evidenziata da altri due studi, in Svizzera e Regno Unito, dove è stato registrato un aumento di sensibilità (58). I dati raccolti dall'identificazione dei cluster di ogni epidemia permettono alle successive indagini di identificare con maggior precisione la fonte di contaminazione. Dal 2004 è stato inoltre istituito un network per la sorveglianza di infezioni e tossinfezioni alimentari, al quale partecipano 56 istituti di sanità pubblica e sicurezza alimentare di 29 Paesi europei, fra i quali l'Italia, che ha lo scopo di monitorare e rilevare in tempo reale cluster di infezioni da *Listeria* (59).

Per quanto riguarda la sorveglianza epidemiologica, nel 1990 la World Health Organization (WHO) ha lanciato un studio internazionale multicentrico sulla listeriosi al fine di creare un sistema epidemiologico unificato e standardizzato (43). Tra il 2005 e il 2009 (ultimo report disponibile: <http://ecdc.europa.eu>) l'incidenza di listeriosi riportata in Europa variava intorno al 0,3 casi/milione di abitanti; i maggiori tassi si registravano nelle nazioni che avevano sistemi di notifica consolidati e flussi organizzati d'informazioni dai laboratori di tutto il territorio: Danimarca (1,76), Svezia (0,79), Belgio (0,54) e Francia (0,51) (Tabella 3).

Tabella 3. Tasso d'incidenza (casi/milione di abitanti) della listeriosi negli Stati Europei (EU) (Fonte: <http://ecdc.europa.eu>).

	2005	2006	2007	2008	2009
Belgio	0,59	0,64	0,54	0,6	0,54
Danimarca	0,85	1,03	1,06	0,93	1,76
Francia	0,35	0,46	0,5	0,43	0,51
Germania	0,62	0,62	0,43	0,37	0,48
Grecia	0,07	0,06	0,09	0,01	0,04
Irlanda	0,29	0,17	0,49	0,3	0,22
Norvegia	0,59	0,39	0,42	0,27	0,27
Regno Unito	0,37	0,35	0,43	0,34	0,38
Svezia	0,45	0,46	0,61	0,65	0,79
Europa	0,33	0,36	0,34	0,3	0,35
Italia	0,1	0,1	0,15	0,2	0,15

Dalla Tabella 3 si evidenzia un aumento dell'incidenza nei Paesi europei, in particolare dove la relazione tra l'investimento pubblico nel migliorare la sorveglianza e il conseguente aumento dei casi riportati si è dimostrata valida. La tendenza all'aumento dell'incidenza di listeriosi dove anche la prevalenza di cancro è aumentata del 40% dal 1992 al 2002, non è quindi giustificabile con l'incremento della popolazione a rischio. Sono molti i Paesi che registrano un'alta incidenza di listeriosi e molti quelli che non hanno sistemi di sorveglianza per stimarla; in aggiunta ai casi sporadici anche le epidemie di *Listeria* che coinvolgono un numero limitato di persone, corrono il rischio di non essere rilevate (43). Nel 2002 si è svolto in Francia un progetto coordinato da due importanti istituti di sorveglianza che ha coinvolto epidemiologi e microbiologi allo scopo di creare

un network europeo in collegamento con la WHO sull'infezione da *Listeria* (60). La formazione di un network di sorveglianza europeo è inoltre necessario per limitare effettivamente il tasso di incidenza di listeriosi contrastando le tendenze che si prospettano a causa dell'aumento della popolazione a rischio previsto per i prossimi anni.

Le fonti informative utilizzate a livello europeo sono descritte nella Tabella 4; molti Paesi possiedono un sistema di sorveglianza per legge, in grado di rilevare la singola infezione o l'insorgenza di un'epidemia, ma molti problemi si rilevano nel suo funzionamento. La listeriosi è notificabile obbligatoriamente solo in dieci paesi europei. Altre modalità di sorveglianza che possono integrare la notifica obbligatoria o costituire l'unico mezzo di indagine sono: i sistemi volontari di raccolta dati, i Centri di Riferimento Nazionali, l'utilizzo di campioni sentinella rappresentativi della popolazione, i sistemi di notifica che registrano esclusivamente le infezioni al Sistema Nervoso Centrale e le batteriemie (recuperando almeno i casi di listeriosi sistemica) e infine la rete di collaborazione tra laboratori di diagnosi del territorio e i medici di base.

La definizione di caso accertato è identica in ogni Paese e si basa sull'isolamento di *Listeria m.* dal paziente, con o senza la specificazione del sito di prelievo e la sintomatologia clinica. La considerazione della presenza di anticorpi anti-*Listeria* per definire il caso è prevista in due Paesi ma in pratica non viene presa in considerazione (60). Nessuna delle nazioni possiede una specifica definizione per la gastroenterite acuta da *Listeria*. Teoricamente, la definizione di caso basata sull'isolamento di *L. monocytogenes* da qualsiasi sito corporeo (non sterile come le feci) in presenza di sintomi, renderebbe la gastroenterite notificabile, ma questo non avviene mai nella pratica, sebbene alcune nazioni tra cui l'Italia (nel 1993 e nel 1997) abbiano avuto casi ed epidemie da gastroenteriti da *L. monocytogenes* sia identificati sia riportati in letteratura a livello nazionale. In generale, la notifica riporta dati relativi al paziente (sesso, data di nascita), informazioni sull'istituto che ha riportato la segnalazione e sull'isolamento del patogeno da parte del laboratorio (data dell'isolamento, tipo di campione analizzato). Informazioni addizionali come la diagnosi principale, l'associazione con gravidanza, gli esiti di malattia, l'inchiesta su viaggi e alimenti possono essere

presenti nelle schede di notifica. Esistono inoltre Centri di Riferimento presenti pressoché in tutti i Paesi (tranne in Irlanda) che svolgono sorveglianza microbiologica, riconoscimento delle epidemie, ricerca sul microrganismo, consulenze diagnostiche e di indagine microbiologica. I campioni possono essere inviati in modo sistematico come avviene in Svezia, in Svizzera o in Francia, o in particolari situazioni come epidemie, anche se solo sospette. I Centri raccolgono inoltre tutte le informazioni relative al campione ed al paziente oltre che gli isolati da alimenti. L'efficienza nel riconoscimento delle epidemie è una caratteristica fondamentale di ogni sistema di sorveglianza; reports e analisi in tempo reale, alta sensibilità, e rapidi risultati di tipizzazione sono indispensabili per l'efficacia degli interventi. Negli ultimi venti anni si è assistito ad un aumento generale delle epidemie, ma anche, ad un proporzionale decremento in Europa del numero di casi correlati ad ogni evento epidemico (casi sporadici); questo fenomeno può essere la dimostrazione del fatto che l'efficienza dei sistemi di controllo sia migliorata negli anni. Nonostante un maggiore impegno da parte di tutti i Paesi, ad eccezione degli USA, i dati sull'incidenza di listeriosi sembrano ancora sottostimare il problema, anche se la consistenza di questa sottostima non è conosciuta: sicuramente i casi meno gravi, e le forme gastrointestinali restano lontani dalla ricerca laboratoristica.

Tabella 4. Sistemi di sorveglianza presenti in Europa; (dati raccolti dal Centro Nazionale Francese di Riferimento per la *Listeria* all'Istituto Pasteur).

PAESE	SISTEMA DI SORVEGLIANZA
Austria	Laboratori di Riferimento, Notifica obbligatoria
Belgio	Laboratori di Riferimento, Notifica obbligatoria
Danimarca	Laboratori di Riferimento, Sorveglianza Meningiti, Laboratori di Riferimento
Inghilterra e Galles	Referto Volontario, Notifica obbligatoria
Finlandia	Laboratori di Riferimento, Notifica obbligatoria
Francia	Laboratori di Riferimento, Notifica obbligatoria, Sorveglianza Meningiti e Sepsi
Germania	Laboratori di Riferimento, Referto Volontario
Grecia	Sorveglianza Meningiti
Islanda	Notifica obbligatoria, Laboratori di Riferimento
Irlanda	Referto Volontario, Notifica obbligatoria
Italia	Sorveglianza Meningiti, Laboratori di Riferimento, Sorveglianza a campione
Paesi Bassi	Notifica obbligatoria
Norvegia	Laboratori di Riferimento
Portogallo	Nessuna Sorveglianza
Scozia	Referto Volontario, Referto Volontario
Spagna	Laboratori di Riferimento, Notifica obbligatoria
Svezia	Laboratori di Riferimento, Notifica obbligatoria
Svizzera	Laboratori di Riferimento
Repubblica Ceca	Laboratori di Riferimento

In Italia nel 1990 tramite Decreto Ministeriale si è istituito un sistema informativo delle malattie infettive e diffuse che sancisce l'obbligo di notifica da parte del medico di tutti i casi di malattie pericolose per la salute pubblica le quali vengono suddivise in cinque classi di notifica. Le regioni sono responsabili della raccolta, dell'analisi e dell'invio al Ministero della Salute dei dati relativi all'incidenza della malattia. Inoltre dal 2002 è stata stabilita una definizione standard dei casi ai fini della dichiarazione delle malattie trasmissibili alla rete di sorveglianza comunitaria individuando quali sono i casi confermati, quali i casi probabili che attendono di essere verificati dalle analisi di laboratorio e quali i casi possibili con un quadro clinico sospetto ma non chiaro. Annualmente viene trasmessa sulla listeriosi una relazione sulle notifiche rilevate alla Commissione Europea. Va sottolineato come finora solo la Lombardia si sia adeguata agli standard europei, con l'adozione delle strutture informatiche indicate e con l'adeguamento delle modalità di registrazione dei casi. E'

sempre questa Regione a fornire da sola quasi il 40% delle notifiche di malattie infettive nazionali registrate annualmente (59).

Ad una sorveglianza passiva si è cercato di affiancare dal 1998, su decisione del Parlamento Europeo, una rete di sorveglianza epidemiologica e di controllo delle malattie trasmissibili nella Comunità che promuove la cooperazione ed il coordinamento tra gli Stati Membri al fine di migliorare la prevenzione ed il controllo delle malattie trasmissibili e con l'ulteriore compito di sostenere una sorveglianza epidemiologica per l'Europa. Nel 2004 è stato inoltre istituito un Centro Europeo con il compito di individuare, valutare e comunicare i rischi attuali ed emergenti di malattia e assicurare la prevenzione ed il controllo delle malattie e il funzionamento integrato di una rete di sorveglianza alla quale tutti i Paesi afferiscono. La sorveglianza nel campo alimentare ha inoltre permesso di rilevare due epidemie di notevoli dimensioni, l'ultima in Piemonte ha coinvolto più di 1500 persone (47); l'attuale incidenza di listeriosi si attesta su 0,2 casi per 100.000 abitanti, ma il valore, alquanto basso, dipende da molte variabili.

Uno studio italiano (59) ha analizzato 4185 campioni alimentari di varia natura presenti in commercio, 958 tamponi eseguiti sulle attrezzature presenti negli ambienti di produzione degli stessi e 77 campioni clinici derivati sia da casi epidemici che sporadici, tutti raccolti nel decennio dal 1990 al 1999. I risultati mostrano una positività per la ricerca della *Listeria m.* nel 12% degli alimenti e nel 9.7% dei campioni ambientali presi in esame, soprattutto quelli relativi a carne e derivati. La metà degli alimenti anche in questo caso è costituita dalla classe dei *ready to eat foods*, tra i quali salami, formaggi e carne cruda. I sierotipi prevalenti sono il sierotipo 1/2a negli alimenti e il sierotipo 4b nei campioni clinici. La distribuzione geografica mostra come la contaminazione alimentare sia più elevata nelle regioni del nord Italia (79% degli isolati) e possa essere riconducibile ad un maggiore commercio di cibi pronti, ed essere in accordo con la prevalenza al nord delle notifiche di malattia anche tenuto conto della consistente quantità di dati non riportati. Risultati simili ha prodotto un successivo studio dove salmone e salumi risultano positivi per *L. monocytogenes* rispettivamente nel 10,6% e 4% dei campioni. In generale questi risultati riportano

livelli di contaminazione del cibo più bassi rispetto a quelli trovati in studi effettuati in USA sulle stesse categorie di cibo (61). Da non dimenticare è il network del Sistema Sanitario costituito dai laboratori veterinari altamente specializzati degli Istituti Zooprofilattici che svolgono attività costante di monitoraggio dei rischi biologici correlati ad alimenti di origine animale e che forniscono molti dati utili per la indagini epidemiologiche (61).

OBIETTIVI

Esiste una discordanza sostanziale tra l'incidenza di listeriosi registrata in Italia e quella registrata nel resto dell'Europa, questo dato fa pensare ad una sottostima dei casi italiani. In aggiunta, gli stessi dati italiani appaiono lacunosi e presentano una marcata disomogeneità da una regione all'altra non spiegabile con una effettiva differenza di diffusione della malattia. Si pensa che questa marcata disomogeneità sia dovuta a parziali carenze nei dei sistemi di registrazione italiani.

La Lombardia è attualmente la Regione che più si avvicina agli standard di controllo epidemiologico europei e che in Italia registra da sola più del 55% di tutte le notifiche nazionali (62). La tesi vuole fornire conoscenze più approfondite riguardo all'epidemiologia della listeriosi in Lombardia, essendo i dati, per questa malattia, sottostimati e carenti. A tal fine si fornirà una analisi descrittiva dei casi, attraverso l'elaborazione dei dati forniti da due diverse fonti informative (notifiche-MAINF e Rete di laboratorio), e una stima dell'incidenza di malattia tramite l'applicazione del metodo statistico di cattura-ricattura. Tale metodo è ritenuto da molti autori il più idoneo allo scopo e vanta di pregressi utilizzi in importanti studi: difetti congeniti come spina bifida, sindrome alcolica neonatale e sindrome di Down (63); per valutare la completezza dei registri di malattia (Schouten LJ, Straatman H, Kiemeny LA, The capture-recapture method for estimation of cancer registry completeness: a useful tool, *Int J Epidemiol*,1994;23:1111-1116); per la stima della popolazione dei consumatori di stupefacenti (6); sensibilità dei sistemi di sorveglianza svedesi per le malattie notificabili (65). Gli studi italiani pubblicati riguardano in massima parte il diabete mellito (66), le fonti utilizzate sono di solito multiple e dipendenti e comprendono soprattutto anche dati di prescrizioni farmacologiche, di esenzione per patologia, e dati di dimissione ospedaliera.

L'utilizzo di due fonti attendibili ed indipendenti è una premessa irrinunciabile per l'applicazione del metodo cattura-ricattura. Contemporaneamente all'analisi epidemiologica descrittiva e statistica, i campioni, raccolti dal sistema basato sulla Rete di Laboratorio, sono analizzati con tecniche

microbiologiche (sierotipizzazione) e biomolecolari (PFGE, MLST), al fine di evidenziare cluster epidemici e per risalire nella catena di contagio in modo da individuare il vettore d'infezione. Abbiamo, inoltre, affiancato un'ulteriore analisi statistica alle analisi genotipiche per confermare l'ipotesi di un'epidemia e per valutare l'entità del focolaio epidemico.

MATERIALI E METODI

Lo studio della listeriosi in Lombardia si compone di tre parti principalmente:

1. studio epidemiologico-descrittivo, basato sulla consultazione, analisi e rielaborazione del database regionale (MAINF) negli anni 2005-2012 e creazione di un database di laboratorio costruito *ad hoc*;
2. studio molecolare degli acidi nucleici dei ceppi di *Listeria monocytogenes* mediante l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare;
3. studio statistico mediante l'utilizzo del metodo "cattura-ricattura" e la creazione di programmi statistici informatizzati per l'analisi spazio-temporale di cluster epidemici.

Studio epidemiologico della listeriosi in Lombardia

- Struttura ed organizzazione del database del sistema MAINF

Nell'ultimo biennio sono state investite molteplici risorse al fine di disporre di un Sistema Informativo delle Malattie Infettive di qualità, in grado di fornire dati epidemiologici utili alla programmazione dei servizi e alla verifica dei risultati.

La creazione del Sistema informatizzato MAINF è il risultato di questi interventi; l'accesso al portale permette l'analisi statistica dei dati del sistema secondo molteplici variabili, offrendo la facoltà di studiare e monitorare l'andamento delle patologie nei diversi territori delle ASL e delle province lombarde.

MAINF viene utilizzato per l'inserimento dei dati relativi alle segnalazioni di malattia infettiva anche in caso di solo sospetto; il sistema consente infatti di inserire una pratica in presenza di minime informazioni poiché l'inserimento delle segnalazioni deve essere effettuato il prima possibile, senza cioè attendere l'avvio dell'inchiesta epidemiologica e la successiva validazione.

Anche qualora il sospetto di malattia infettiva non venisse confermato o non fosse possibile la validazione per la notifica, il sistema provvederà a conservare le informazioni in vista di ulteriori approfondimenti.

Per la registrazione iniziale della scheda di malattia infettiva nel sistema MAINF sono obbligatori i seguenti dati, tutti comunque modificabili all'acquisizione di nuove informazioni: dati anagrafici del soggetto (nome, cognome, data di nascita, sesso); data inizio sintomi; esito della malattia; regione di contagio; data di segnalazione; tipo di struttura che effettua la segnalazione; stato vaccinale del soggetto. Il portale consente l'accesso alle seguenti schede:

- Scheda Anagrafica: contenente le informazioni relative all'identificativo della persona, dati riferiti al recapito e dati socio-anagrafici;
- Scheda Dati Generali: da questa scheda è possibile inserire da un elenco la patologia del soggetto. Vengono specificate le manifestazioni cliniche ed anche i dettagli geografici circa luogo di contagio e struttura di ricovero ed infine la storia vaccinale del soggetto;
- Scheda Contagio: costituisce la fonte informativa atta a stabilire il collegamento epidemiologico delle patologie, anche ai fini della validazione. Si fa riferimento alla fonte di esposizione ed eventuali relazioni con i viaggi;
- Scheda Diagnosi: viene compilata per tutte le malattie infettive per le quali è stato individuato l'agente eziologico isolato tramite coltura/esame di laboratorio, indicando in particolare l'agente eziologico e il relativo fenotipo;
- Scheda Profilassi: contenente i dati relativi all'attuazione di profilassi, soprattutto in caso di terapia antibiotica o vaccinazione;
- Scheda Fattori di Rischio: devono essere distinti dall'esposizione ed attengono a condizioni individuali che predispongono al contagio o che possono comportare una maggiore probabilità di sviluppo di malattia con manifestazioni cliniche;
- Scheda Esiti/ Criteri: in questa sezione vengono inseriti tutti gli esami che hanno concorso alla definizione della diagnosi, anche quando negativi;

- Scheda Amministrativa: contiene le informazioni relative alla validazione e assegnazione alle ASL;
- Focolai Epidemici: sono presenti informazioni su agente eziologico, ente di riferimento e persone a rischio (Manuale di MAINF, disponibile sul sito di MAINF www.portalebi.regione.lombardia.it).

Per avere accesso ai dati relativi alle malattie infettive per l'esportazione su foglio di calcolo e la successiva elaborazione dei dati è necessario accedere alla sezione Statistiche epidemiologiche e successivamente alla sezione Analisi Malattie Infettive.

Le altre sezioni presenti nel portale includono:

- Accertamenti Agente Eziologico, per l'analisi dei casi con accertamento ed agente eziologico;
- Contagio, per l'analisi dei casi e modalità di contagio;
- Fattore Rischio, per l'analisi dei casi e correlazione con i fattori di rischio;
- Focolai, per l'analisi dei focolai epidemici;
- TBC, per l'analisi dei casi di TBC;
- AIDS, per l'analisi dei casi di AIDS;
- Tassi Regione, per la valutazione dell'incidenza della patologia per ASL di residenza, classe di età e sesso;
- Tassi ASL, per la valutazione dell'incidenza regionale della patologia per classe di età e sesso.

I dati registrati all'interno del sistema sono presenti in forma di dati aggregati, senza specifiche sui singoli pazienti; consultando la sezione Scheda Anagrafica è possibile reperire i dati anagrafici di ciascun paziente, che offrono la possibilità di analizzare i singoli casi di malattia e fare analisi più approfondite. Entrando nella sezione Analisi Malattie Infettive compare una tabella illustrante i casi totali per anno per tutte le malattie infettive registrate dal sistema nel

periodo 2000-2012, a cui vengono poi applicati gli appositi filtri per selezionare i dati di interesse ai fini dell'analisi.

La funzione Filtro può essere applicata per selezionare le informazioni secondo questi parametri: inizio sintomi; patologia; ASL residenza; criterio di validazione nazionale (equivalente a notificabile); ASL diagnosi; classificazione regionale; residenza; regione di residenza; sesso.

I dati sono stati filtrati utilizzando il filtro Patologia e analizzando di volta in volta le patologie di interesse; le infezioni da *L.monocytogenes* sono inserite nelle apposite sezioni. Criterio di validazione delle malattie a trasmissione alimentare inserite nel database MAINF è l'identificazione in laboratorio del patogeno all'esame colturale.

L'elaborazione dei dati estratti dal sistema MAINF è stata condotta mediante l'analisi dei dati aggregati, per descrivere l'andamento e le caratteristiche epidemiologiche delle infezioni da *L.monocytogenes* nel periodo 2005-2012.

-Struttura ed organizzazione del database basato sulla Rete di Laboratorio.

Il sistema basato sulla rete di Laboratori è un sistema di sorveglianza degli isolamenti di laboratorio su base volontaria attivo in regione Lombardia dal 2005; in seguito ad ogni isolamento, lo stipo viene inviato mediante infissione in provetta al laboratorio Enteropatogeni per l'Italia Settentrionale dell'Università degli Studi di Milano. Qui si provvede alla compilazione di un database interno e non disponibile online, in cui ad ogni ceppo è assegnato un codice numerico progressivo. Le informazioni contenute nel database sono:

- iniziali nome e cognome
- Ospedale in cui è avvenuto il ricovero
- Data del ricovero
- Data di nascita
- Sesso
- Comune di residenza
- Diagnosi d'ammissione
- Diagnosi di dimissione
- Sintomatologia gastrointestinale

- Evoluzione
- Fattori di rischio
- Sito d'isolamento di *Listeria m.*
- Data prelievo e isolamento

I laboratori referenti delle Asl della regione Lombardia sono tenuti ad inviare al centro di riferimento regionale tutti i ceppi isolati di *Listeria monocytogenes* nel minor tempo possibile.

Il centro regionale ha il compito di espletare le analisi microbiologiche e genetiche dei ceppi e la conservazione di tutti gli stipiti raccolti; inoltre, ogni 4 mesi, vengono svolte attività di analisi e rielaborazione dei dati epidemiologici e clinici, e viene redatto, ed inviato a tutte le Asl Lombarde, un bollettino informativo.

Incrocio dei sistemi di sorveglianza per stimare l'incidenza reale di listeriosi mediante l'utilizzo del metodo statistico Cattura-Ricattura

La concordanza delle fonti è stata calcolata valutando in modo comparativo i tassi di registrazione di due database regionali che raccolgono le schede di notifica obbligatoria delle malattie infettive (MAINF) e dalle schede allegate agli stipiti raccolti dal Sistema di Laboratorio nel periodo preso in considerazione, calcolati dopo avere ottenuto i casi di malattia stimati mediante metodo cattura-ricattura.

Il metodo “cattura-marcatura-ricattura” è originariamente nato, all'inizio del Novecento, nell'ambito dell'ecologia animale terrestre e acquatica con lo scopo di ottenere una stima delle popolazioni dal confronto di due differenti fonti di dati. Il primo era costituito dagli animali marchiati e rilasciati in libertà, il secondo dai nuovi capi ricatturati. Utilizzando il numero di animali presenti in entrambi i gruppi e la grandezza di ciascun campionamento, è possibile stimare le quantità mai catturate e la grandezza totale della popolazione (67).

I primi ad utilizzarlo in ambito epidemiologico, sono stati Sekar e Deming, nel 1949, per stimare, negli Stati Uniti, gli indici di natalità e di mortalità e per valutare i limiti del sistema di registrazione

e, quindi, l'applicazione è stata estesa a diversi obiettivi: stima della popolazione colpita quando sono disponibili due o più fonti chiaramente incomplete; verifica dell'incidenza e della prevalenza ottenute da fonti presumibilmente complete; valutazione della completezza di un registro che raccoglie rapporti da fonti differenti.

Il modello più semplice chiamato anche metodo della registrazione duale, si ispira a quello messo a punto da Petersen (1896) e successivamente adattato da Chapman con due campioni di popolazione (68). L'applicazione presume che siano verificati determinati presupposti metodologici (69). Alcuni di questi sono impliciti: la certa e corretta diagnosi, l'effettivo verificarsi del caso nell'area geografica e nel periodo di tempo considerati, altre assunzioni necessarie sono:

- 1) tutti gli individui della popolazione oggetto dello studio devono avere la medesima probabilità di essere "catturati" da ciascuna delle fonti: non ci devono essere fattori che influenzino la distribuzione dei pazienti nelle banche dati utilizzate (ad esempio tipo di presentazione clinica, sesso del paziente, severità del caso, luogo di residenza, ecc);
- 2) le due fonti devono essere indipendenti l'una dall'altra: la presenza in una lista di un paziente non deve modificare la probabilità di comparire nell'altra. L'indipendenza delle fonti è la condizione più importante dal momento che se si evidenzia una dipendenza, positiva o negativa, si rischia rispettivamente di sottostimare o di sovrastimare la patologia in studio;
- 3) la popolazione deve essere "chiusa": ossia la numerosità della popolazione non deve subire variazioni importanti nel periodo di studio (es. migrazione).
- 4) tutti gli individui devono essere riconosciuti in maniera univoca e precisa (es. codice fiscale, data di nascita e prime tre iniziali del nome e del cognome) per ottenere la corretta identificazione di ogni soggetto ed eseguire un esatto "incrocio" dei casi presenti nelle diverse fonti.

Tabella 5. Schematica descrizione del metodo cattura ricattura.

		FONTE 1		
		registrati	non registrati	
FONTE 2	registrati	a	b	N ₂
	non registrati	c	x	N
		N ₁		

Dove:

a=casi registrati da ambo le fonti

b=casi registrati solo da una fonte

c=casi registrati solo dall'altra fonte

x=stima dei casi non registrati da nessuna fonte $(X) = bc/a$

N= numero casi osservati = a+b+c

N=stima del numero di casi = $[(N_1+1) \cdot (N_2+1)/(a+1)] - 1$

Tasso di Esaustività Fonte 1 = $E_1 = N_1 / N = a / N_2$

Tasso di Esaustività Fonte 2 = $E_2 = N_2 / N = a / N_1$

Tasso di Esaustività Fonti Combinate = $N_1 + N_2 - a / N$

Le maggiori difficoltà, non sempre superabili, derivano dalla non corrispondenza della realtà con tali assunzioni; in particolar modo vanno verificati l'assunto di "indipendenza" delle fonti e di "catturabilità" dei campioni. Con quest'ultimo termine, definito come E, si intende la probabilità di un soggetto di essere catturato da una fonte, di conseguenza, le fonti sono dette indipendenti se l'insieme delle probabilità di catturare un soggetto di ogni fonte è uguale a E stessa, ovvero nello specifico che $E = E_{\text{fonte1}} \cdot E_{\text{fonte2}} \cdot N$.

Se la probabilità di cattura varia nello stesso senso per le due fonti (ad esempio un caso di maggiore gravità ha più probabilità di essere catturato da entrambe le fonti) il numero totale dei casi è sovrastimato, se, viceversa, varia in senso opposto (ad esempio quando un caso di maggiore gravità aumenta la probabilità di comparire in una fonte e riduce quella di essere rilevato da una seconda fonte) il numero dei casi risulterà sottostimato. In generale l'indipendenza delle fonti è un assunto fondamentale per l'utilizzo del metodo poiché conoscendo il tipo di dipendenza delle fonti, positiva

o negativa, è possibile valutare se il risultato finale rappresenta rispettivamente una sottostima o una sovrastima del valore reale: se $E < E_1 E_2$, ad esempio, una fonte è inclusa nell'altra, il metodo sovrastima la reale efficienza delle fonti, e di conseguenza sottostima la popolazione N , se $E > E_1 E_2$ avviene il contrario (Hook E, Regal R. Capture-recapture methods in epidemiology: methods and limitations. *Epidemiol Rev*, 1995;17:243-263). E' anche possibile calcolare la completezza delle due fonti utilizzate: questa, per ogni fonte, è definita come il numero di casi presenti in entrambe le fonti rapportato al numero totale di casi segnalati dall'altra fonte. Nella nostra indagine il metodo cattura-ricattura è stato applicato utilizzando le due fonti di dati rappresentate dalle schede di notifica obbligatoria delle malattie infettive e dalle schede allegate agli stipiti ricevuti dai laboratori. Tali fonti rispondono ai requisiti richiesti per l'applicazione del metodo, infatti, per entrambe le fonti:

- è presumibile che la diagnosi sia stata posta con certezza dal momento che è sempre necessario l'isolamento di *L. monocytogenes* da un sito normalmente sterile;
- ogni soggetto della popolazione considerata ha la stessa probabilità di essere rilevato per ciascuna delle fonti, avendo un'uguale possibilità di accesso ai servizi sanitari;
- si può ragionevolmente ritenere che le due fonti siano indipendenti; i flussi informativi sono distinti e non si influenzano;
- riguardo alle coordinate di tempo e spazio, le fonti consentono di riconoscere i casi che si sono verificati in un'area geografica definita (la Regione Lombardia) e di escludere casi insorti in cittadini non residenti in Lombardia; per quanto riguarda il periodo di tempo considerato, sono stati inclusi in ogni anno i casi in funzione della data di ricovero del paziente presente nella scheda correlata al ceppo e la data di notifica riportata per le notifiche (la data di inizio della sintomatologia non era riportata in tutte le notifiche).

Al fine di effettuare l'incrocio dei dati sono stati utilizzati i codici identificativi, sesso, età, data di nascita e provincia di residenza del paziente presenti in entrambe le fonti per tutti i casi.

Sierotipizzazione

La tipizzazione viene effettuata utilizzando sieri immuni che reagiscono con antigeni tipici dei batteri gram-positivi: l'antigene H è presente a livello flagellare, è di natura proteica e tremolabile; l'antigene O somatico fa parte della porzione di natura polisaccaridica della parete cellulare del batterio ed è invece termostabile. *L. monocytogenes* viene suddivisa in 13 differenti "sierotipi" in base agli antigeni somatici O e a quelli flagellari H. La sierotipizzazione viene eseguita utilizzando gli antisieri forniti dalla ditta Biogenetics s.r.l.. Il test si esegue sulla sospensione batterica, appositamente preparata, messa a contatto con l'antisiero specifico, osservando l'agglutinazione determinata dalla reazione antigene-anticorpo che appare entro un minuto. Per la determinazione degli antigeni somatici viene utilizzata la procedura fornita con gli antisieri della Biogenetics s.r.l., mentre per la determinazione degli antigeni flagellari si utilizza una metodica in micrometodo messa a punto da Ueda F. (70), qui di seguito descritto:

In una prima fase avviene la determinazione degli antigeni somatici, coltivando i ceppi in esame in agar sangue o TSA + YE per 18 ore a 37°CØ. Si iluire i batteri precoltivati fino a 10 mg/ml (un'ansata di patina batterica/ml) con una soluzione 0,2% NaCl e avviene il trattamento in autoclave dei campioni a 121°C per 30 min. I campioni vengono tolti dall'autoclave e quando la temperatura è di 80°C, vengono centrifugati a 3.000 rpm per 20 min., rimosso il surnatante e risospeso ciascun pellet con una piccola quantità di nuova soluzione 0,2% NaCl. Infine avviene la dispensazione su vetrino di una goccia di Antisiero polivalente somatico O I/II , una di Antisiero polivalente somatico O V/VI e una (30 µl) di soluzione fisiologica (controllo). Mediante ansa sterile, viene deposto, in prossimità delle 3 gocce, una goccia (10 µl) della sospensione batterica ed emulsione accurata, usando 3 anse differenti. Agitando delicatamente il vetrino ed osservando l'agglutinazione rigorosamente entro 1 minuto; si considerano positive solo le reazioni ben evidenti. In caso di reazione positiva con l'Antisiero polivalente somatico O I/II, si ripetono le fasi come sopra descritte ma usando i sieri monovalenti O I e O IV per l'ulteriore identificazione. In caso di

reazione positiva con l'Antisiero polivalente somatico O V/VI, si ripetono le fasi come sopra descritte ma usando i sieri monovalenti O VI, O VII, O VIII e O IX per l'ulteriore identificazione.

In secondo luogo avviene la determinazione degli antigeni flagellari: per lo sviluppo della mobilità dei batteri al fine di favorire la ricerca degli antigeni flagellari, viene fatta la semina per 3 volte in agar per mobilità ed incubato a 25°C, inoculando il terreno per infissione ed eseguendo le subcolture dopo aver prelevato il materiale dall'estremità delle propaggini della zona di crescita. Si semina un'ansata del ceppo, sempre prelevandola dalle propaggini della zona di crescita, in 2 ml di BHI broth; incubazione a 30°C per 18 ore. Viene aggiunta alla sospensione batterica così ottenuta di una uguale quantità di soluzione fisiologica contenente l'1% di formalina. Si alleste la piastra nel seguente modo: dispensazione di 7,5 µl di ciascuno dei 4 differenti antisieri (A – AB – C – D) sul fondo dei pozzetti delle rispettive colonne della piastra microtiter, aggiunta a ciascun antisiero, nei 4 pozzetti della riga corrispondente a ciascun ceppo, di 50 µl di sospensione batterica del ceppo stesso e nel 5° pozzetto della riga corrispondente a ciascun ceppo dispensazione di 60 µl di sospensione batterica del ceppo stesso, come controllo negativo (pozzetto senza antisiero), per ogni piastra uso come controllo positivo di un ceppo di riferimento di *Listeria monocytogenes*, trattato come i ceppi in esame, agitazione accurata in agitatore, incubazione a bagnomaria a 50°-52°C per 1 ora prima lettura della micropiastra dal fondo, su specchio lettore, evitando bruschi movimenti, la seconda lettura dopo aver lasciato la micropiastra per un notte a temperatura ambiente (il risultato rimane stabile per 24h).

Sono stati individuati 15 antigeni somatici O (indicati con numeri romani da I a XV) e 4 antigeni flagellari (denominati A, B, C e D) e attualmente la classificazione in uso per la specie *L. monocytogenes* comprende 17 sierotipi. Il 95% degli stipiti isolati dall'uomo appartiene ai tre sierotipi: 1/2a, 1/2b e 4b. Questi sierotipi non sono specifici per la specie *Listeria monocytogenes*, essendo alcuni condivisi dalle altre specie del genere (71).

Gli stipiti di sierotipo 4b e 1/2a sono isolati con maggiore frequenza da campioni clinici, mentre negli alimenti prevalgono i sierotipi 1/2a e 1/2b (72) (59). Anche se i diversi studi mostrano

frequenze differenti, il sierotipo 4b sembra quello maggiormente coinvolto sia nei casi di listeriosi sporadica che in quelli epidemici (approssimativamente nel 40% di tutte le infezioni). Negli ultimi anni sono stati messi a punto anticorpi monoclonali leganti in modo specifico gli antigeni 4b di *Listeria spp* in modo da screenare più rapidamente gli isolati clinici o alimentari (73).

Tipizzazione Biomolecolare Mediante PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis).

L'utilizzo della PFGE consente, mediante il confronto dell'impronta del DNA (DNA fingerprinting), di capire se isolati di *L. monocytogenes* possono derivare dallo stesso clone cellulare. Questa tecnica fornisce informazioni importanti ai fini epidemiologici.

A tal proposito, il DNA viene digerito in frazioni di diversa lunghezza grazie ad endonucleasi di restrizione e successivamente viene fatto correre su un gel d'agarosio per separare i frammenti originati e misurarne così il numero e il peso molecolare (espresso in paia di basi: bp). Quello che si ottiene è un profilo di restrizione unico per ciascun clone, costituito da bande evidenziate mediante fluorescenza dalla colorazione con bromuro di etidio. Tale profilo di restrizione permette l'individuazione del ceppo esaminato e il confronto con profili ottenuti da altri ceppi della stessa specie. Il più comune metodo di separazione di molecole di DNA di grandezza compresa in un range tra 0,1 Kb e 30 Kb è il gel-elettroforesi orizzontale. Quando la misura del DNA è al di sopra delle 30 Kb, si utilizza l'elettroforesi su gel in campo pulsato (Pulsed-Field Gel Electrophoresis o PFGE). Tale tecnica ideata da Schwartz e Cantor nel 1983 utilizza due campi elettrici con differenti angolazioni, applicati alternativamente al gel di Agarosio per periodi di tempo definiti, dell'ordine di secondi. L'azione del primo campo causa uno stiramento lungo il piano orizzontale delle molecole di DNA e il loro movimento nel gel. L'interruzione di questo campo e l'azione del secondo fa sì che le molecole si muovano nella nuova direzione. Tenendo presente che per una molecola a catena lunga lineare esiste una relazione tra il cambiamento conformazionale indotto da un campo elettrico e la lunghezza della molecola stessa, le molecole più piccole si riallineranno più velocemente nel nuovo campo elettrico e quindi continueranno a muoversi attraverso il gel.

Molecole più grandi al contrario impiegheranno più tempo per allinearsi. Variando continuamente la direzione del campo elettrico sarà quindi possibile separare le molecole quelle più piccole da quelle più grandi. La PFGE permette di separare frammenti di DNA fino a 10 Mb. La tecnica, secondo il protocollo PULSE-NET (Allegato A) previsto dal circuito europeo ENTER-NET (<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>), prevede l'utilizzo di terreno in piastra di TSA (Tryptone Soya Agar) su cui vengono fatti crescere gli isolati; le cellule batteriche vengono raccolte direttamente dalle piastre. Successivamente vengono risospese in CSB (Cell Suspension Buffer: 100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8) sino ad ottenere una densità di 0,50-0,55 O.D. (unità di densità ottica) a 600 nm. Poiché il DNA cromosomico può danneggiarsi facilmente, le cellule batteriche vengono inglobate in una matrice d'agarosio a forma di blocchetti. Si prepara un gel d'agarosio al 2% in TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) e si lascia scendere la temperatura del gel fino a 55°C. Contemporaneamente si prelevano 500 µl della sospensione cellulare ai quali si aggiungono 20 µl di Proteinasi K (pari a 8 unità) e si unisce con l'agarosio in modo da ottenere un rapporto 1:1; si cola in uno stampo e si lascia solidificare per 10 minuti a 4°C. Ogni blocchetto d'agarosio che contiene le cellule batteriche viene lasciato per 2 ore in una soluzione di lisi, Clysib (50mM Tris, 50mM EDTA, 1% Sarkosyl, 0,1 mg/mL Proteinasi K, pH8), in agitazione in un bagnetto a 55°C. Il blocchetto d'agarosio con le cellule incluse viene quindi lavato due volte utilizzando acqua distillata sterile alla temperatura di 50°C; successivamente vengono effettuati tre lavaggi in TE alla stessa temperatura. I blocchetti così ottenuti possono essere conservati per molti mesi a 4°C per successive analisi. Al momento dell'analisi del DNA, uno dei tasselli conservati, dello spessore di 2 mm, viene posto a contatto con 100 µl di una soluzione contenente 84 µl di acqua nuclease-free, 10 µl di Buffer di reazione, 1 µl di Bovin Serum Albumine (BSA) e 5 µl dell'enzima AscI oppure ApaI. Si lascia ad incubare a 37°C over-night (in alternativa è prevista anche un'incubazione di 4 ore a 37°C). Si prepara un gel d'agarosio all'1% in 150 mL di TBE 0,5X, si cola nel supporto e si lascia solidificare. Si caricano i campioni nei pozzetti e si sigilla con l'agarosio con cui sono stati fatti i blocchetti diluito in TE fino all'1%. L'apparato utilizzato per la

corsa elettroforetica è del tipo Contour-clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) (BioRad) in cui gli elettrodi sono disposti ad esagono nella vasca in modo da generare un campo elettrico con angolo di 120° in tutte le parti del gel. Con questa tecnica si ottengono bande molto nette e piste di migrazione ben dritte poiché in tutte le direzioni del gel il DNA è sottoposto alle stesse condizioni (6V/cm (200V), switch time 2-64s, tempo di corsa 18ore alla temperatura di 14°C). Per visualizzare le bande il gel viene colorato con bromuro d'etidio 1 µl in 100 ml acqua distillata) e osservato al transilluminatore UV. L'immagine del gel, che sarà utilizzata per l'analisi e l'interpretazione dei profili, viene fotografata, salvata in formato TIFF e analizzata con il software BioNumerics (BioRad) in grado di confrontare le diverse bande ottenute ed effettuare eventuali correlazioni tra i diversi ceppi, in modo da capire se vi è una discendenza clonale (74).

Tipizzazione Biomolecolare Mediante MLST (Multilocus Sequencing Type)

Multilocus Sequencing Type (MLST) è una tecnica di biologia molecolare utilizzata per la tipizzazione che sfrutta la differenza di basi nucleotidiche in frammenti di DNA, a questo scopo possono essere presi in esame o geni housekeeping oppure geni di virulenza. Mediante l'utilizzo di due PCR in sequenza, i geni d'interesse vengono prima isolati, poi amplificati e successivamente sequenziati entrambi i filamenti (circa 450-500 bp) usando un sequenziatore di DNA automatizzato. Il primo protocollo MLST sviluppato è stato per la *Neisseria meningitidis*, l'agente eziologico umoristico di meningite e la setticemia meningococcica (75).

L'MLST analizza la sequenza di basi del DNA dei geni housekeeping e caratterizzato i ceppi in base ai loro profili allelici. Il principio di MLST è semplice: la tecnica comporta una prima amplificazione dei geni d'interesse, seguita da una seconda PCR di sequenza e infine il sequenziamento del frammento di DNA. I geni housekeeping presi in esame sono: ABC transporter (abcZ), beta-glucosidase (bgIA), catalase (cat), succinyl diaminopimelate desuccinylase (dapE), d-amino acid aminotransferase (dat), l-lactate dehydrogenase (ldh), histidine kinase (ihkA) (76). L'amplificazione dei geni d'interesse è stata eseguita utilizzando i primer riportati in tabella 6.

Tabella 6. La sequenza delle basi dei primers utilizzati per l'ampificazione PCR e il sequenziamento dei geni housekeeping di *Listeria monocytogenes*.

Gene	Primer and sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>abcZ</i>	<i>abcZ</i> -Up, TCGCTGCTGCCACTTTTATCCA	<i>abcZ</i> -Dn, TCAAGGTCGCCGTTTAGAG
<i>bglA</i>	<i>bglA</i> -Up, GCCGACTTTTTATGGGGTGGAG	<i>bglA</i> -Dn, CGATTAAATACGGTGCGGACATA
<i>cat</i>	<i>cat</i> -Up, ATTGGCGCATTITGATAGAGA	<i>cat</i> -Dn, AGATTGACGATTCTGCTTTTG
<i>dapE</i>	<i>dapE</i> -Up, CGACTAATGGGCATGAAGAACAAG	<i>dapE</i> -Dn, ATCGAACTATGGGCATTTTTACC
<i>dat</i>	<i>dat</i> -Up, GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA	<i>dat</i> -Dn, TGCGTCCATAATACACCATCTTT
<i>ldh</i>	<i>ldh</i> -Up, ATTTTGATCGTATTGGGGTTTT	<i>ldh</i> -Dn, TACTGAATGGATTAGCGAAGATGA
<i>lhkA</i>	<i>lhkA</i> -Up, AGAATGCCAACGACGAAACC	<i>lhkA</i> -Dn, TGGGAAACATCAGCAATAAAC

Il primer per il gene *ldh* è stato modificato (www.pasteur.fr/mlst) (77).

Le cellule batteriche vengono lisate mediante sonicazione (10 min) e successivamente centrifogate per 5 min. Le condizioni di PCR sono: denaturazione iniziale a 94°C per 4 min seguita da 25 cicli di denaturazione a 94°C per 30 s, riappaiamento dei filamenti a 52°C per 30 s (eccetto per *bglA* che a una temperatura di annealing di 45°C), ed amplificazione a 72°C per 2 min seguita da uno step finale di 72°C per 10 min. I frammenti di DNA sono purificati usando il kit di purificazione (Qiagen) e sono sequenziati in entrambe le direzioni con Big Dye fluorescent terminators (PE Applied Biosystems) sul sequenziatore Applied Biosystems Prism 377.

Gli alleli e il sequence type (St) sono assegnati sottomettendo le sequenze di DNA all' "Listeria MLST database" presso il Pasteur Institute, France (www.pasteur.fr/mlst). La comparazione degli STs è stata eseguita utilizzando l'albero filogenetico costruito mediante l'utilizzo software Bionumerics (BioRad). MLST è una tecnica di fingerprinting con numerosi vantaggi: molto standardizzata e riproducibile, le sequenze di primer e i protocolli sono disponibili gratuitamente online (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>), automatizzata, fornisce un buon potere discriminante per differenziare isolati batterici, l'accumulo di variazioni nucleotidiche nei geni housekeeping è un processo relativamente lento e il profilo allelico batterico è stabile nel tempo, caratteristica fondamentale che permette l'utilizzo di questa tecnica nell'epidemiologia

globale. Questa tecnica molecolare è un'importante risorsa scientifica utilizzabile in differenti ambiti: sanità pubblica, veterinaria e nell'industria alimentare. La filogenesi degli isolati analizzati viene visualizzata, come per la PFGE, in un dendrogramma.

Analisi Statistica

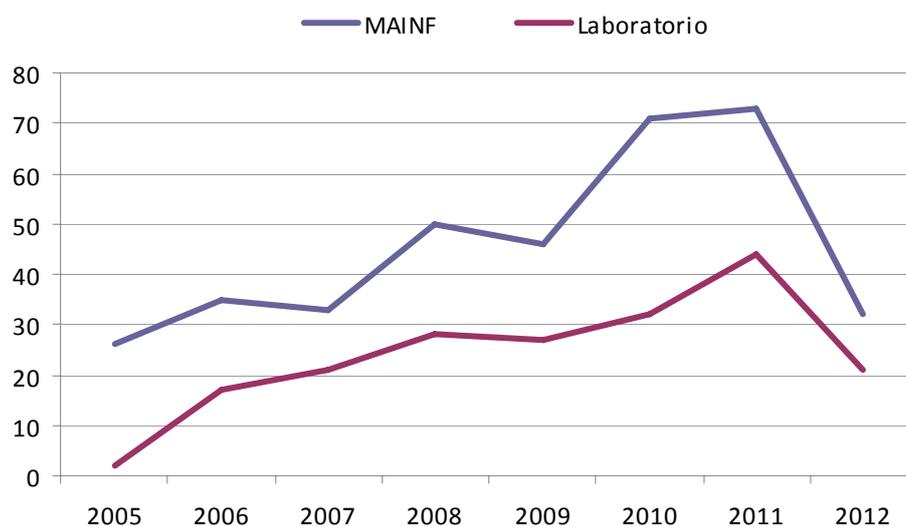
Test adattivo sull'omogeneità del processo di Poisson che descrive i casi di listeriosi nel tempo. Il test statistico riguardante la disposizione dei casi di listeriosi nel tempo si basa sull'ipotesi nulla che il processo segua una distribuzione di Poisson omogenea. Infatti l'ipotesi di indipendenza dei casi e la rarità degli eventi sono perfettamente descritti da tale distribuzione; in caso di rigetto dell'ipotesi nulla, si può quindi affermare che esiste dipendenza tra i casi di listeriosi riscontrati (78). Per prima cosa abbiamo definito la variabile temporale per ciascun caso di listeriosi: abbiamo posto come "tempo zero" la data di ricovero del primo caso rilevato nel 2009 e abbiamo associato ad ogni paziente la distanza contata in giorni da tale data. Poi abbiamo usato Matlab per calcolare le statistiche con i dati temporali ottenuti e per avere il risultato dei test corrispondenti con un livello di significatività a $p=0.05$. Dal primo test statistico abbiamo ottenuto un primo risultato che stabilisce la distribuzione temporale dei casi. Successivamente abbiamo sottoposto i dati ad un ulteriore test che ci permette di identificare quando e dove si è verificata un'epidemia di listeriosi accoppiando le variabili "provincia" e "anno di ricovero". In questo caso il campione è costituito dalle variabili aleatorie che contano il numero di casi riscontrati per "anno" e "provincia". L'ipotesi nulla è che le variabili che descrivono ogni anno in ogni provincia il numero di casi siano distribuite secondo una Poisson. Questo dimostra che si ipotizza omogeneità nella distribuzione dei casi nello spazio e nel tempo; se si rigetta l'ipotesi nulla si ottiene quindi che in un determinato luogo e anno c'è stata una concentrazione di casi diversa. In particolare a noi interessa sapere se si può riscontrare un'epidemia, cioè un aumento significativo nel numero di casi rilevati in un determinato luogo e anno.

RISULTATI

Analisi epidemiologica descrittiva

Fra il 2005 e il 2012 la sorveglianza speciale della Rete di Laboratorio ha registrato un totale di 192 casi di listeriosi, con un trend in progressiva crescita: si è passati da 2 isolamenti nel 2005 a 44 nel 2011. Parallelamente, nello stesso intervallo di tempo, sono stati notificati al sistema MAINF della Regione Lombardia 366 casi di listeriosi, delineando un andamento ugualmente in crescita, che ha visto quasi triplicare il numero di notifiche nel periodo esaminato: da 26 casi nel 2005 (tasso di incidenza: $0.27/10^5$ abitanti) a 73 nel 2011 (tasso: $0.68/10^5$ abitanti), anno in cui è stato raggiunto il picco di incidenza (Figura 4). L'andamento delle segnalazioni nei due sistemi informativi è rappresentato nella Figura 4.

Figura 4 Andamento dei casi di listeriosi e degli isolamenti di laboratorio di *Listeria m.* nel periodo 2005-2012 (Dati MAINF e Rete di Laboratorio)



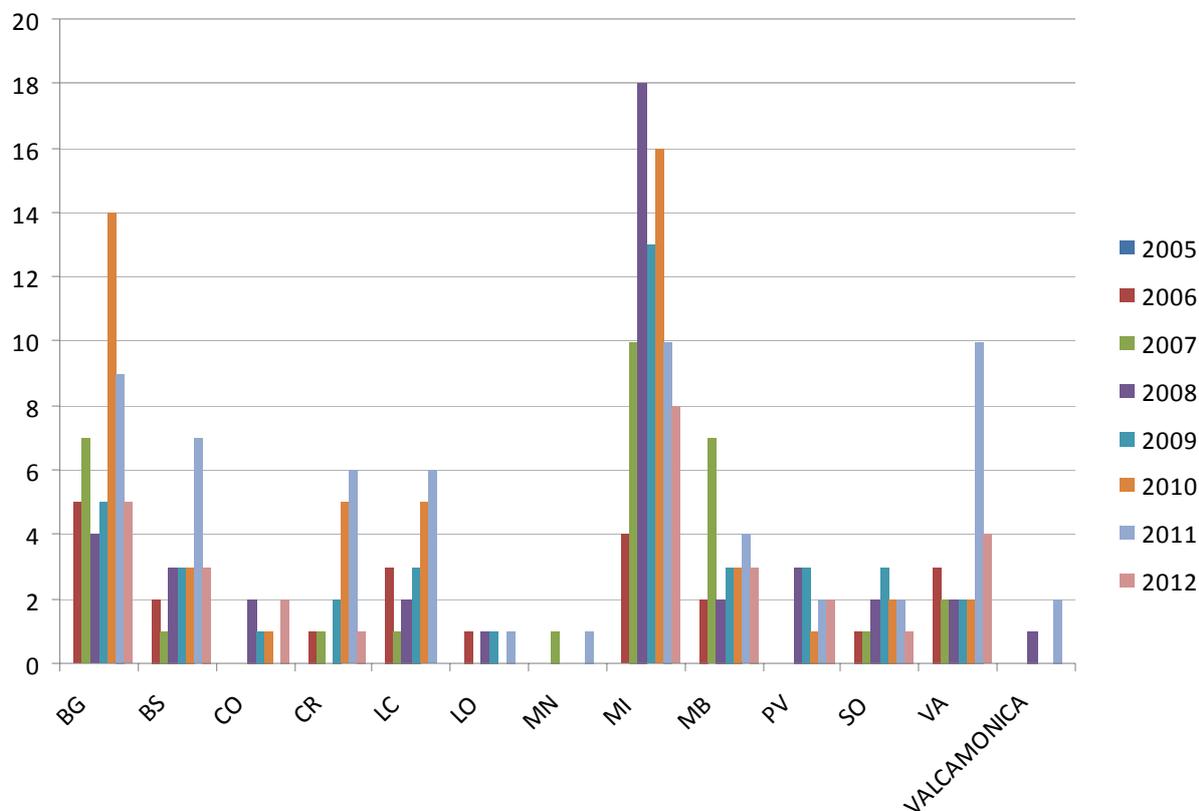
Per quanto riguarda la distribuzione dei casi di listeriosi registrati dal sistema MAINF per sesso e classi di età la maggior parte dei casi di malattia (66% del totale) ha interessato la fascia di età superiore ai 65 anni, seguita dalla classe 45- 64 anni (20% del totale). Il minor numero di casi è

stato registrato per le classi di età 5-24 anni e 0-4 anni, comprendenti rispettivamente il 2% e il 3% dei casi totali di listeriosi. La malattia ha interessato i due sessi in misura praticamente equivalente. Dall'analisi condotta sui dati provenienti da MAINF è stato riscontrato che il numero dei casi ha un picco di massima incidenza in Luglio (13.8% degli isolamenti) e Agosto (11.1%) ed un valore minimo nei mesi di Febbraio, Marzo, Giugno e Settembre (circa 5%).

Calcolando, in base ai dati di notifica (MAINF), i tassi di incidenza nelle diverse ASL della Lombardia si osserva che nel periodo esaminato i maggiori tassi sono stati riportati per quelle di Milano, Lodi e Bergamo. In particolare si nota che:

- in 2 ASL (Mantova e Valcamonica-Sebino) le segnalazioni risultano rare;
- in 5 ASL (Como, Milano, Monza e Brianza, Pavia e Varese) l'incidenza è inferiore a $0,5/10^5$ durante tutto il periodo di osservazione;
- i tassi più elevati ($>1/10^5$) sono stati riscontrati nelle ASL di Bergamo e Milano;
- l'incremento più significativo è stato osservato nella ASL Città di Milano (nel 2011 il tasso risulta circa 5 volte superiore a quello del 2005);
- nelle ASL di Milano, Lodi, Pavia e Sondrio si è verificato un decremento del tasso di incidenza durante il periodo in esame;

Figura 5. Andamento dei casi di listeriosi negli anni e per singole ASL lombarde (Dati MAINF Regione Lombardia: 2005-2012)



Se si considerano i dati raccolti dal sistema di sorveglianza facente capo alla Rete di Laboratorio, il maggior numero di isolamenti di *Listeria monocytogenes* nel periodo in analisi è stato riportato dalle province di Milano (101 isolamenti) e Bergamo (47 isolamenti) in testa in ogni singolo anno, seguite da Brescia (14 isolamenti) e Lodi (10 isolamenti), Varese e Pavia (9 isolamenti); sono stati, invece, riportati solamente 2 isolamenti dalla provincia Monza Brianza (Tabella 7). Le incidenze per provincia sono in accordo con le incidenze MAINF e vedono Bergamo, Lodi e Milano in testa (tabella 7).

Tabella 7. Numero di casi e incidenza di listeriosi per singole ASL lombarde (Dati di laboratorio: 2005-2012)

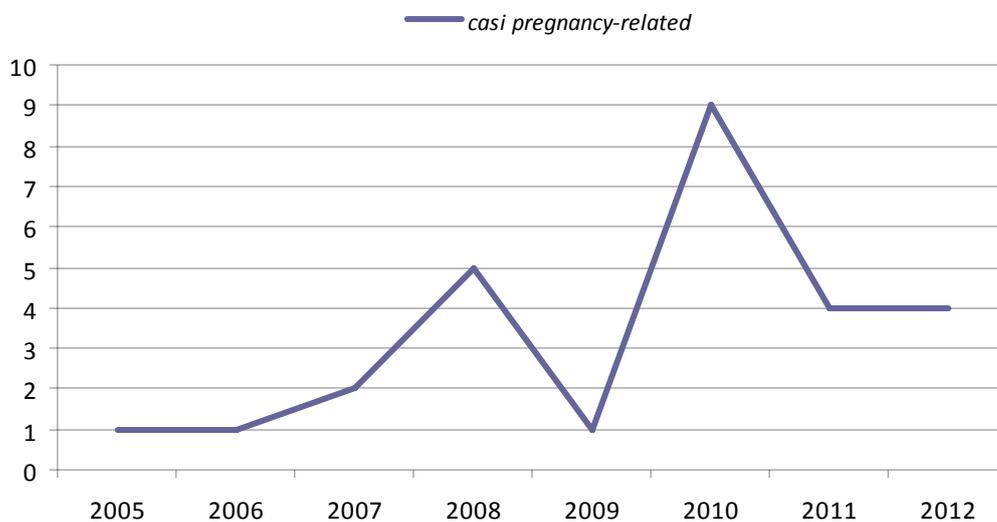
Provincia	Numero Casi	Incidenza (x 10 ⁵)
BG	47	0,9
BS	14	0,2
CO	3	0,1
CR	7	0,4
LO	10	0,9
MI	101	0,6
MB	2	0,0
PV	9	0,3
VA	9	0,2

Per quanto concerne la modalità di esposizione all'infezione da *L. monocytogenes* l'analisi dei dati provenienti dal sistema delle notifiche MAINF ha rilevato che nel 79% dei casi il dato non è risultato noto. Per quanto riguarda le pratiche in cui l'informazione è conosciuta, la principale modalità di esposizione è risultata quella alimentare (21% dei casi), suddivisa in consumo di alimenti di preparazione artigianale/industriale (10% dei casi), consumo di alimenti in ambiente domestico (3%) e consumo di alimenti conservati in modo inadeguato (2%). Il restante 6% è stato incluso nella voce "Altro", ad indicare una diversa modalità di esposizione comprendente, fra gli altri, i rari casi di soggiorno all'estero o in altre regioni italiane.

Il database MAINF non permette la valutazione dei fattori di rischio associati all'infezione da *L. monocytogenes*, che possono, però, essere studiati dal database della Rete di Laboratorio. Il principale fattore di rischio per la listeriosi è rappresentato da una neoplasia maligna in atto o pregressa (28,4% degli isolamenti), seguito dallo stato di immunodepressione (idiopatica, da AIDS o da farmaci immunosoppressori) (25,8%) e dal diabete mellito di tipo 2 (16,3%). Altri importanti fattori di rischio, anche se riscontrati con minore frequenza rispetto ai precedenti, sono l'insufficienza renale (14,6%), le emopatie (13,8%) e le epatopatie (12,9%). In 49 casi è stata riportata una combinazione di più condizioni patologiche nello stesso paziente; l'associazione clinica più spesso identificata (10 casi) è risultata quella composta da neoplasia e

immunodepressione, sia come conseguenza della patologia tumorale, soprattutto se ematologica, sia in seguito alle terapie effettuate. Di particolare interesse sono i casi associati alla gravidanza, situazione fisiologica che rappresenta l'unico fattore di rischio nel 11,7% degli isolamenti dei quali questo dato è conosciuto nel periodo compreso fra il 2005 e il 2012; tralasciando il primo anno dell'attività di sorveglianza, in cui si erano registrati solo 2 casi (uno dei quali correlato alla gravidanza), negli anni successivi il numero dei casi materno-neonatali è risultato molto variabile, con un minimo nel 2009 (1 caso) ed un massimo nel 2010 (7 casi) (Figura 6) per un totale di 24 ceppi raccolti e 23 casi, poiché due ceppi sono stati raccolti dalla madre e dal bambino e quindi vengono considerati un unico caso.

Figura 6. Ceppi di listeriosi correlata e non correlata alla gravidanza dal 2005 al 2012 (Dati di laboratorio)



La presentazione clinica della listeriosi è stata estratta ed analizzata dal database MAINF, da cui è stato possibile ricavare l'informazione in modo più sintetico e codificato rispetto al database di Laboratorio. È emerso che nella maggior parte dei pazienti (35% dei casi) la patologia ha interessato il Sistema Nervoso Centrale, con quadri di meningite o meningoencefalite, mentre nel 22% dei casi l'infezione ha determinato un quadro di sepsi. Nel 10% dei casi non è stato riportato

nel sistema il dato relativo alla presentazione clinica e nel 25% dei casi il dato è stato inserito all'interno della voce "altro". Sono stati, inoltre, segnalati quadri di enterocolite (diarrea, dolori addominali, febbre) encefalite (con coinvolgimento unicamente parenchimale) e polmonite.

L'evoluzione clinica della listeriosi è stata estratta dal database di Laboratorio: nel 46% dei pazienti da cui era stata isolata *L. monocytogenes* l'evoluzione è risultata favorevole, nel 17% la malattia ha determinato il decesso del paziente e nel 19% la prognosi al momento della compilazione della scheda era incerta, mentre nel restante 18% il dato non è noto.

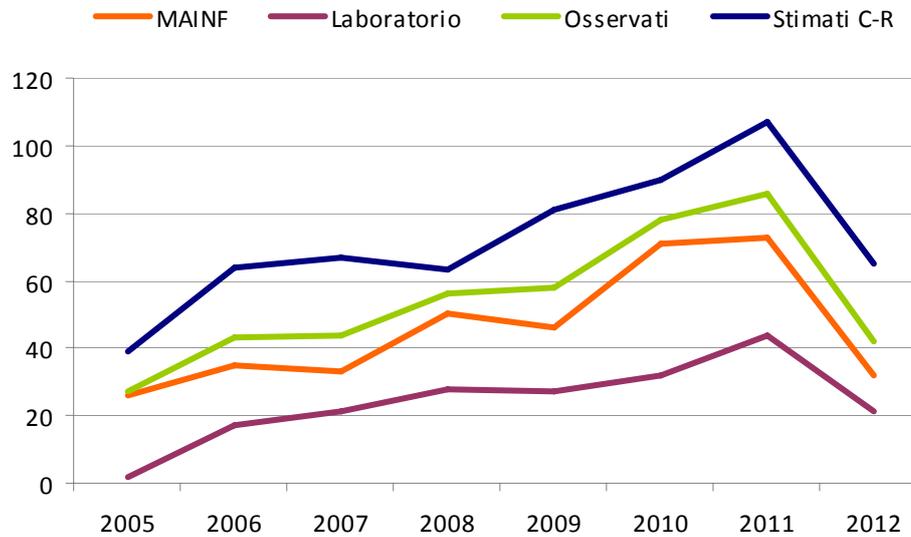
Analisi statistica mediante l'utilizzo del metodo Cattura-Ricattura

I dati raccolti dal sistema MAINF e dalla Rete di Laboratorio sono stati "incrociati" per individuare i casi registrati da ambo le fonti e quelli invece individuati soltanto da una di esse. I casi totali osservati sono dati dalla somma dei casi individuati solo dalle notifiche, quelli riconosciuti solo dalla rete di Laboratorio e quelli catturati-ricatturati, cioè rilevati da entrambe le fonti (Tabella 8). I casi stimati (C-R casi), sono stati ottenuti grazie all'applicazione del metodo cattura-ricattura così come spiegato in Materiali e Metodi (Tabella 5). L'andamento dei casi osservati e di quelli stimati non è costante negli anni, ma si può notare una tendenza all'incremento fino all'anno (2011) dello studio (Figura 7).

Tabella 8. Casi osservati dalle singole fonti e stima dei casi totali.

Anni	MAINF	Lab	Solo Notifiche	Solo Laboratorio	Casi comuni	Casi osservati	C-R casi (I.C.95%)	C-R incidenza
2005	26	2	25	1	1	27	39	0,42
2006	35	17	26	8	9	43	64	0,67
2007	33	21	23	11	10	44	67	0,7
2008	50	28	28	6	22	56	63	0,65
2009	46	27	31	12	15	58	81	0,83
2010	71	32	46	7	25	78	90	0,9
2011	73	44	42	13	31	86	107	1,15
2012	32	21	21	10	11	42	65	0,7

Figura 7. Curva dei casi osservati da ciascuna delle due fonti, dei casi totali osservati e stimati (2005-2012).

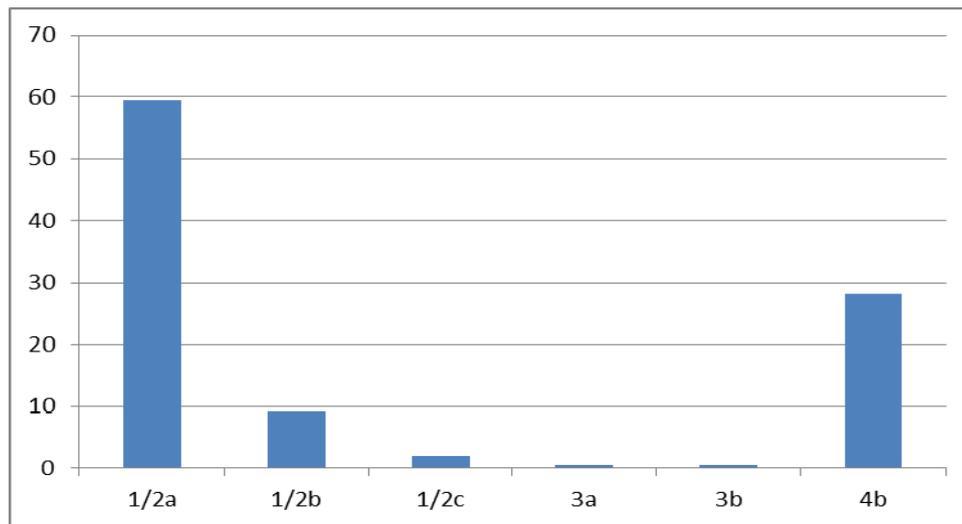


Analisi biomolecolare

Sierotipo

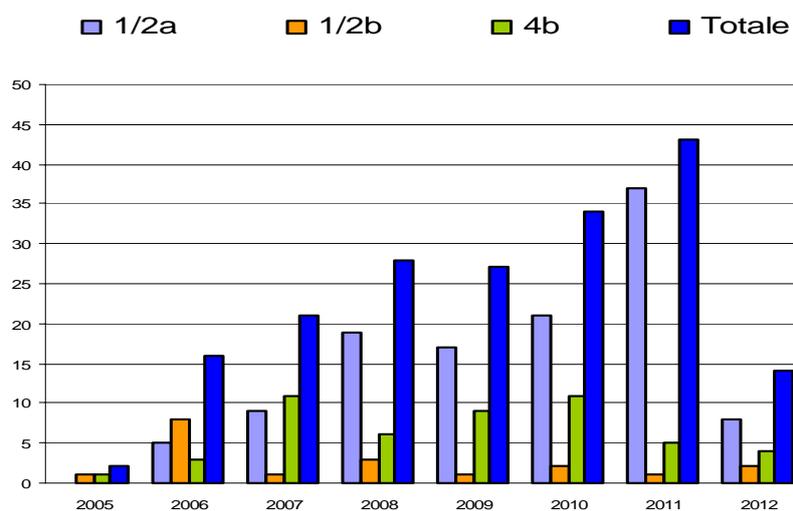
A proposito della sierotipizzazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* raccolti è risultato che quelli più frequentemente coinvolti sono l'1/2a (59.5%), l'1/2b (9.1%) e il 4b (28.1%), sia nei casi correlati, sia in quelli non correlati alla gravidanza (Figura 8); tuttavia nell'arco del periodo in studio sono stati identificati anche stipti meno comuni, quali l'1/2c (1 caso), il 3b (1 caso) e il 4d (4 casi), sempre isolati in casi non correlati alla gravidanza.

Figura 8. Frequenza dei sierotipi dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati dal 2005 al 2012.



Dalla valutazione dei sierotipi è stato possibile notare, inoltre, un incremento nel tempo dei casi determinati dal ceppo 1/2a, associato ad una diminuzione degli isolamenti dell'1/2b e del 4b (Figura 9); quest'ultimo sierotipo, al contrario, prevale nelle forme associate alla gravidanza.

Figura 9. Andamento dei principali sierotipi di *Listeria monocytogenes* negli anni 2005-2012.



PFGE

Sono stati analizzati mediante PFGE 192 ceppi di *Listeria monocytogenes* (Figura 10) ed analizzati mediante l'utilizzo del software BioNumerics (Biorad) che permette la costruzione del

dendrogramma per affinità di profili (Figura 11). I differenti pulsotipi evidenziati utilizzando l'enzima di restrizione AscI risultano essere 76. Diciassette ceppi hanno mostrato pulsotipi AscI unici, mentre i rimanenti sono stati raggruppati in 15 gruppi/cluster con pulsotipo con omologia maggiore dell'80% all'interno dello stesso gruppo. Solo 10 dei 15 cluster contengono più di tre ceppi. I profili dei ceppi ottenuti utilizzando l'enzima di restrizione ApaI mostrano la stessa suddivisione in cluster di quelli ottenuti dall'analisi con AscI.

Figura 10. Gel PFGE con 12 campioni di *Listeria monocytogenes* analizzati mediante l'enzima di restrizione AscI e 3 marker (*Salmonella braenderup* H9812) nel 1°, 8° e 15° pozzetto.

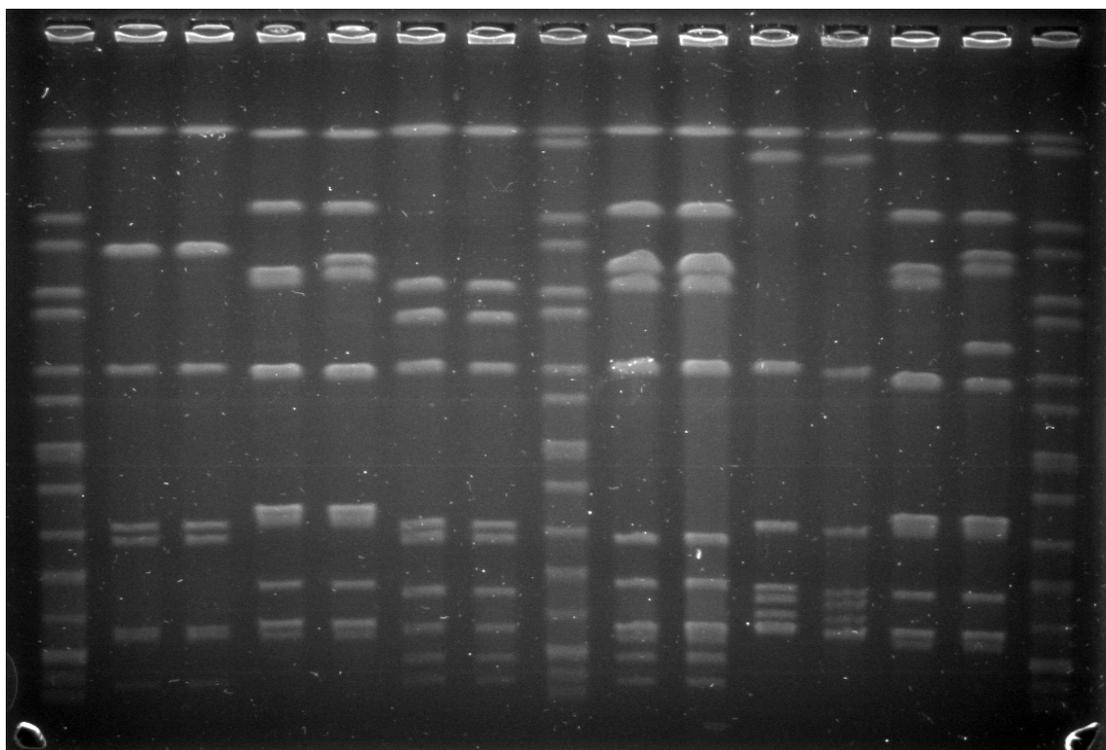
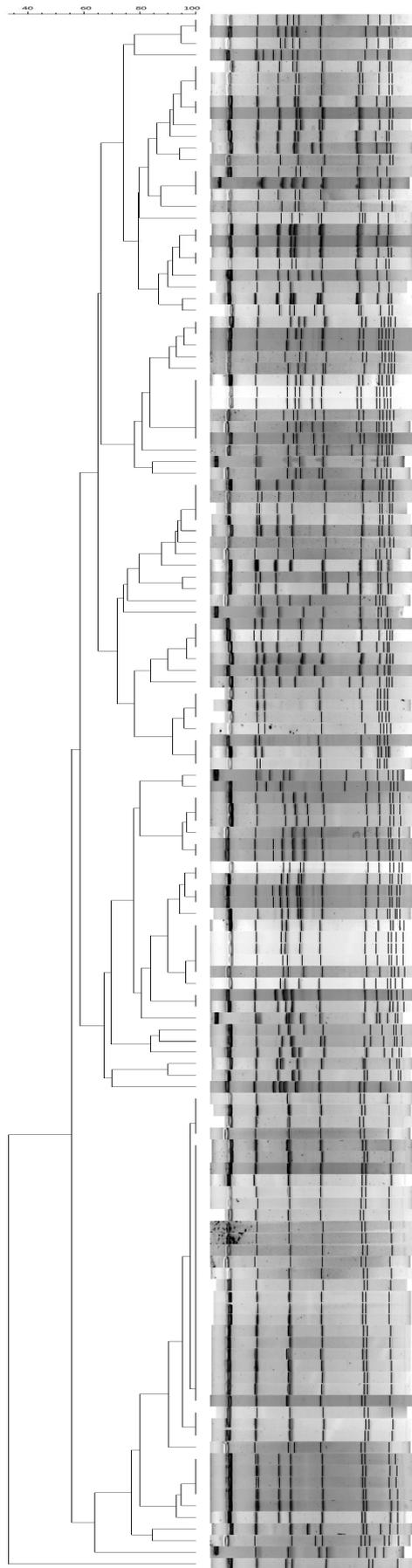
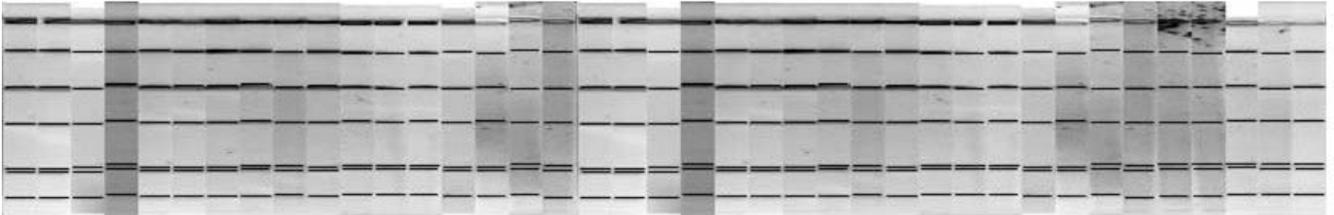


Figura 11. Dendrogramma dei profili molecolari dei ceppi di *Listeria monocytogenes* ottenuti dall'analisi PFGE utilizzando l'enzima AscI .



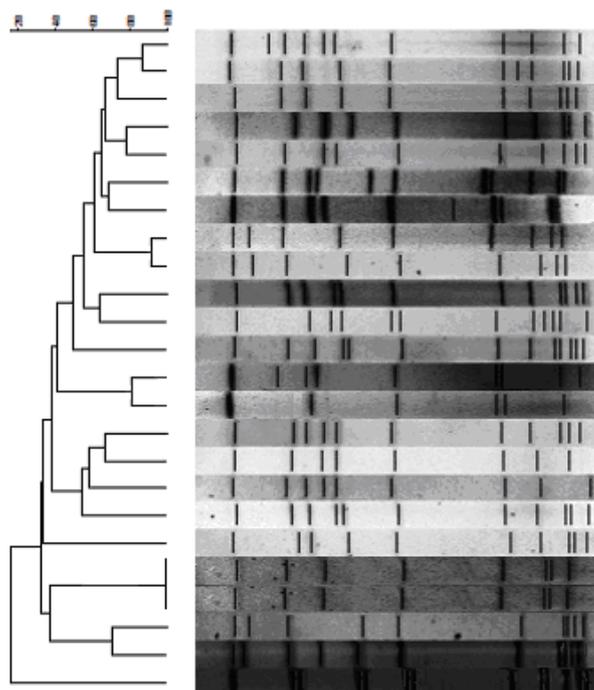
Il pulsotipo 14 (Figura 12) raggruppa 39 campioni con omologia maggiore del 95% e rappresenta il cluster più grande da noi individuato.

Figura 12. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 14.



Meritano una particolare attenzione i casi *pregnancy-related*. L'analisi PFGE ha mostrato la sostanziale diversità dei 24 stipiti isolati (Figura 13); l'unica analogia, oltre ovviamente al caso isolati sia dalla madre che dal bambino in cui il medesimo batterio infetta entrambi, è stata rilevata fra il clone isolato dal caso 3 e quello estratto dal caso 8. Si tratta di stipiti con una percentuale di correlazione superiore al 95% e dunque considerati uguali.

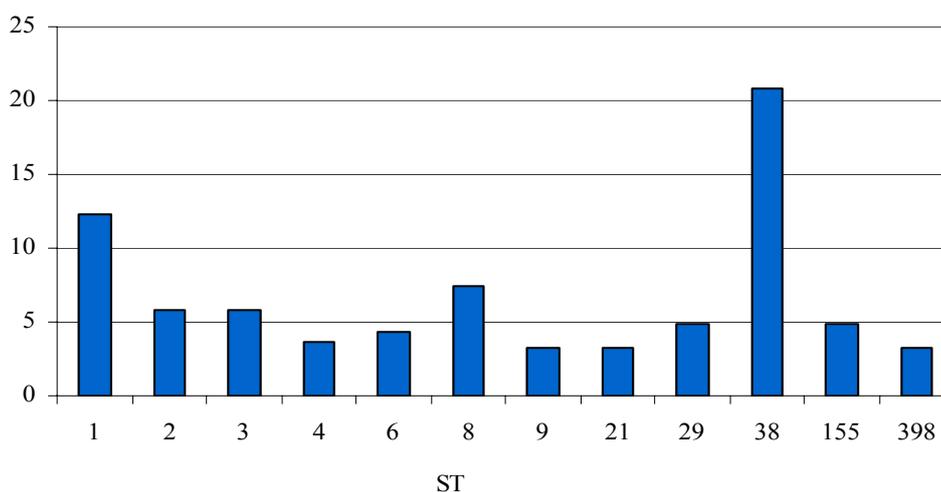
Figura 13. Dendrogramma dei casi di listeriosi *pregnancy-related*.



MLST

I gruppi determinati in base all'uguale profilo STs ottenuto dall'analisi MLST coincidono perfettamente con i cluster risultati dall'analisi PFGE. Dodici risultano essere gli STs che raggruppano più di 6 campioni ciascuno. Possiamo evidenziare un grosso gruppo di ceppi (39 campioni) con ST 38. Inoltre è molto interessante sottolineare 6 ceppi con ST 21 presenti in banca dati europea (Istituto Pasteur: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>) solo nell'uomo e nei roditori, nessun ceppo ST 21 isolato da alimenti.

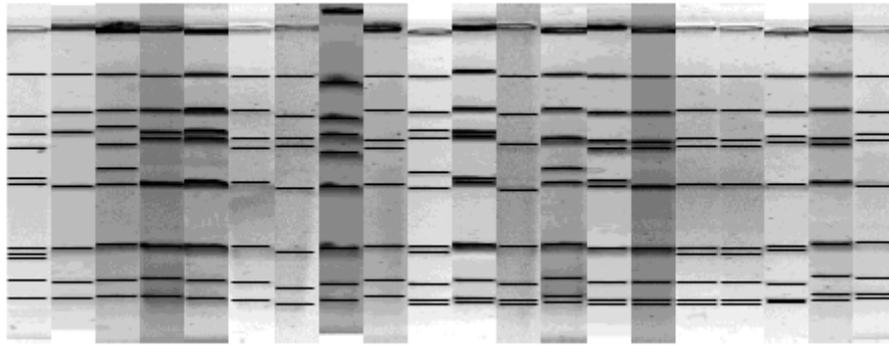
Figura 14. Distribuzione percentuale dei principali STs.



ANALISI CLUSTER PRINCIPALI

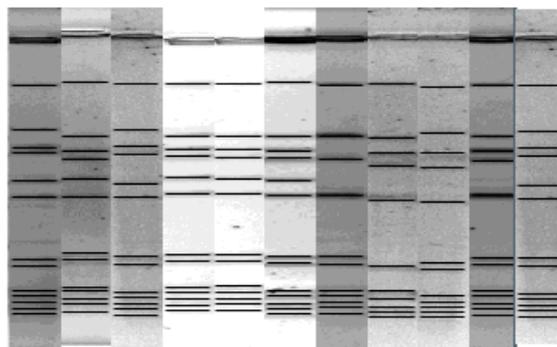
Cluster 2 e 3 include 20 isolati di sierotipo 4b, appartenente alla ST 1 (Figura 15). Sono stati identificati ceppi durante tutto il periodo in esame, 12 casi hanno manifestato setticemia e 5 meningite, mentre uno è associata alla gravidanza. Gli isolati *non pregnancy related* sono distribuiti in modo uniforme tra i due sessi (8 maschi e 12 femmine). Undici casi sono stati riscontrati nei soggetti di età superiore a 65 anni. In 13 casi è stata registrata una condizione di base, in particolare 6 casi con neoplasia. Sei casi hanno avuto esito letale.

Figura 15. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 2 e 3.



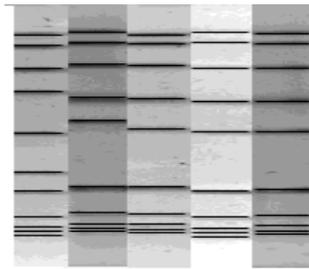
Cluster 4 include 11 isolati di sierotipo 1/2b, appartenenti al ST 3 (Figura 16). Dieci sono i casi di setticemia e uno di meningite in questo cluster. Gli isolati sono stati identificati in entrambi i sessi (sei femmine vs cinque maschi). Cinque soggetti hanno età maggiore di 65 anni e sette casi avevano evidenti fattori di rischio. Otto isolati di sierotipo 4b, appartenenti a ST2, possono essere raggruppati a seconda del pulsotipo nel **cluster 5**. Sono stati identificati tra il 2007 e il 2010 da quattro casi di meningite e tre di setticemia. Un isolato è definito *pregnancy related*, mentre gli altri isolati sono più frequenti nel sesso femminile (cinque femmine e due maschi). Quattro casi sono presenti in soggetti di età superiore ai 65 anni. In sei pazienti sono stati evidenziati condizioni pregresse.

Figura 16. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 4.



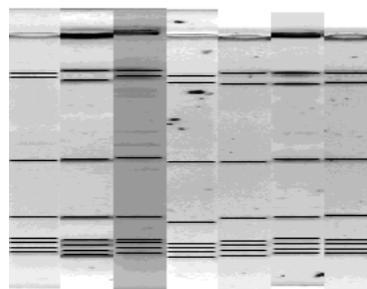
Cluster 7 comprende cinque isolati di sierotipo 4b, appartenente alla ST 4 (Figura 17). I ceppi sono stati isolati da due casi di meningite e due di setticemi. Due casi sono associati alla gravidanza, un paziente aveva più di 65 anni.

Figura 17. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 7.



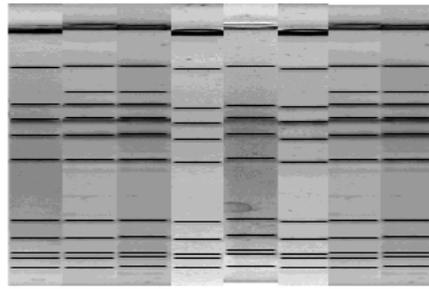
Cluster 8 contiene sette isolati di sierotipo 4b con ST 6 (Figura 18). Essi sono stati isolati nel 2007 e nel 2010 da tre casi di setticemia, due di meningite e tre casi di infezione risultano in donne gravide. Nessuna persona infetta ha età superiore ai 65 anni .

Figura 18. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 8.



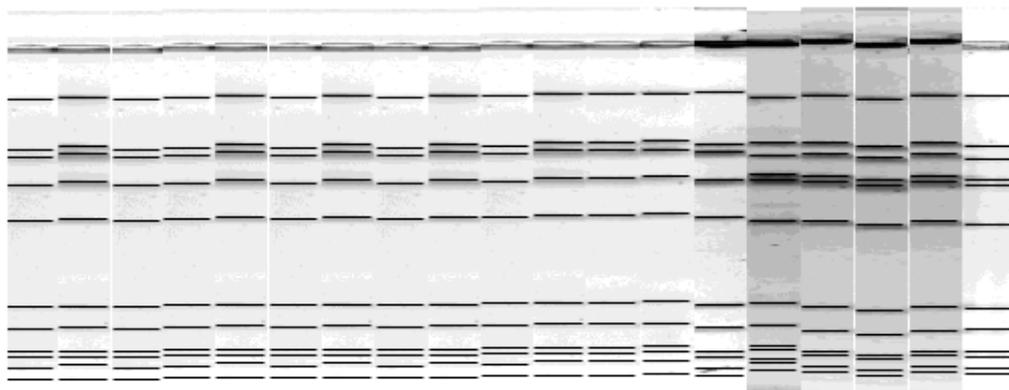
Nove ceppi di sierotipo 1/2a e ST 29 raggruppati nel **cluster 10** (Figura 19). Essi sono stati isolati nel 2007 (2 casi), 2008 (3 casi), 2009, 2010, 2011 e 2012 (un caso per ciascun anno). Questi ceppi hanno provocato quattro casi di setticemia, due di meningite e un caso di infezione risulta correlato alla gravidanza. Entrambi i sessi sono stati coinvolti. In 4 casi il fattore di rischio era la neoplasia e in un caso un emopatia, mentre le informazioni su 3 pazienti non sono disponibili. Cinque sono i pazienti di età superiore ai 65 anni.

Figura 19. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 10.



Cluster 11 incluso 5 isolati di sierotipo 1/2a, appartenenti alla ST 398 e 14 isolati di ST 8 (Figura 20). Sono stati identificati 2006-2011 da 7 casi di setticemia, 3 di meningite e 3 casi associati alla gravidanza. Tra i casi non correlati con la gravidanza, 10 maschi e 6 pazienti femmine, 10 avevano un'età maggiore di 65 anni.

Figura 20. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 11.



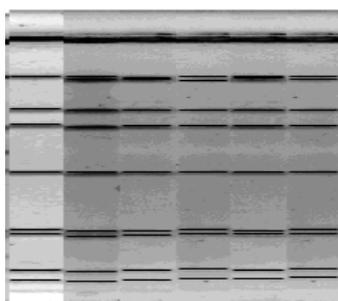
Cluster 14 è il più grande cluster evidenziato, di cui 39 isolati con sierotipi 1/2a e ST 38 (Figura 12). L'identificazione di questi isolati è iniziata nel 2006 (2 isolati) ed è proseguita nel 2007 e nel 2008 (con 1 e 2 isolati rispettivamente) e ha raggiunto il picco nel 2009 e nel 2010 con 11 e 16 casi, e infine nel 2011 con 8 casi d'infezione. Attraverso l'intero periodo, i casi sono stati distribuiti in otto province della Lombardia con la più alta prevalenza di Bergamo.

Questi isolati hanno causato 26 casi di setticemia e 8 di meningite e in due casi l'infezione è correlata alla gravidanza. Gli isolati non associati alla gravidanza sono più frequenti nel sesso

femminile (21 femmine vs 15 maschi). Trentuno infezioni (79.5%) soggetti colpiti più di 65 anni. Tutti i casi hanno fattori di rischio: cancro (13 casi), terapia immunosoppressiva (6 casi), diabete mellito (4 casi), insufficienza renale (4 casi), la cirrosi epatica / epatite cronica (4 casi), neoplasie ematologiche (un caso), l'alcolismo (2 casi). Cinque casi hanno avuto esito fatale.

Infine, sei ceppi di sierotipo 1/2a e ST21 raggruppate nel **cluster 15** (Figura 21). Essi sono stati isolati tra il 2006 e il 2009 da quattro casi di setticemia, una di meningite e un ascesso latero-cervicale. Quattro maschi e due pazienti di sesso femminile sono stati coinvolti. In tutti i casi una malattia di base era presente. Ad eccezione di un caso, con 60 anni di età, tutti i pazienti avevano più di 65 anni.

Figura 21. Profili PFGE di ceppi di *L.monocytogenes*: pulsotipo 15.

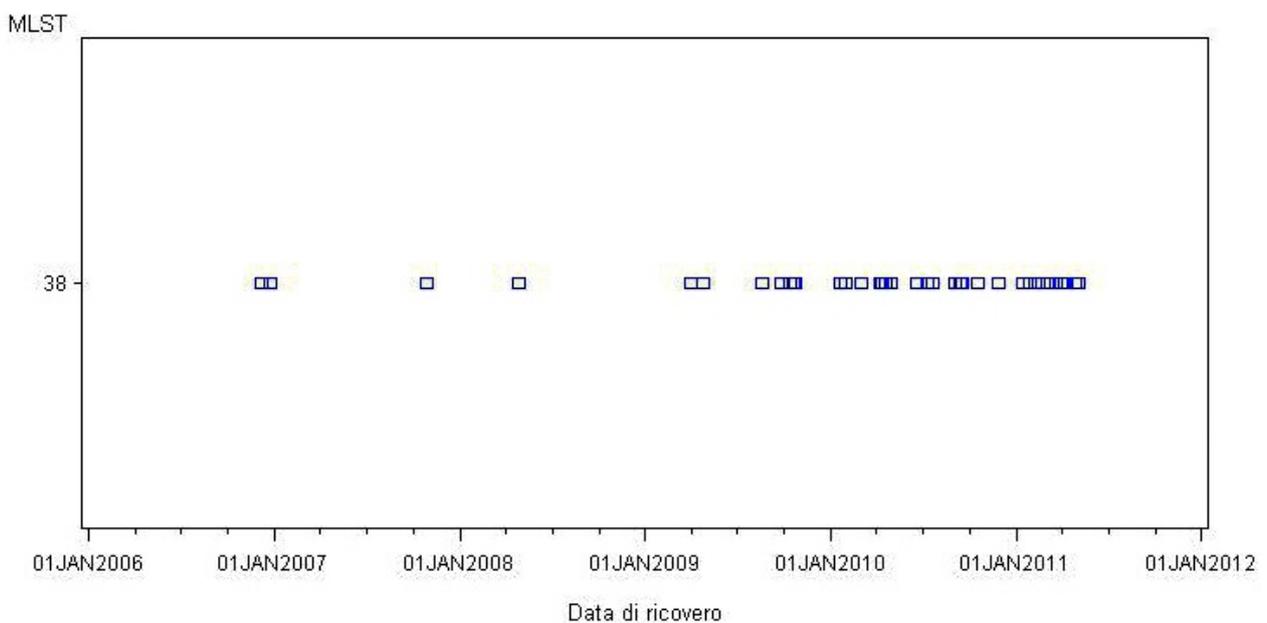


Analisi statistica

Al fine di identificare i focolai epidemici e valutare il gruppo di 39 ceppi con medesimo pulsotipo e ST 38 abbiamo affiancato all'analisi genotipica un'analisi statistica che utilizza un primo test basato sull'analisi della variabile "tempo" (nel nostro caso è stato considerato "l'anno di ricovero"). Mediante l'utilizzo di test statistici informatizzati costruiti *ad hoc* per questo progetto da un gruppo di matematici-statistici, abbiamo ottenuto un primo risultato che stabilisce la non casualità nella distribuzione temporale dei casi. L'idea che è alla base dello studio che segue è quella di partire dall'ipotesi nulla che i casi di listeriosi siano distribuiti del tutto casualmente nel tempo; l'ipotesi alternativa che si vuole testare è che ci sia invece un fattore di correlazione tra le collocazioni

temporali dei casi. In questo secondo caso si potrebbe quindi affermare che in determinate circostanze si sia verificata un'epidemia di listeriosi. Il test che abbiamo utilizzato considera soltanto il posizionamento dei dati sulla retta temporale e utilizzano i metodi adattivi per verificare l'omogeneità del processo di Poisson che descrive i dati (Figura 22). Poiché dal test risulta che esiste una dipendenza tra le date di rilevazione dei casi, abbiamo quindi applicato un secondo test sulle variabili "provincia" e "anno" accoppiate, volto a individuare le epidemie nello spazio e nel tempo.

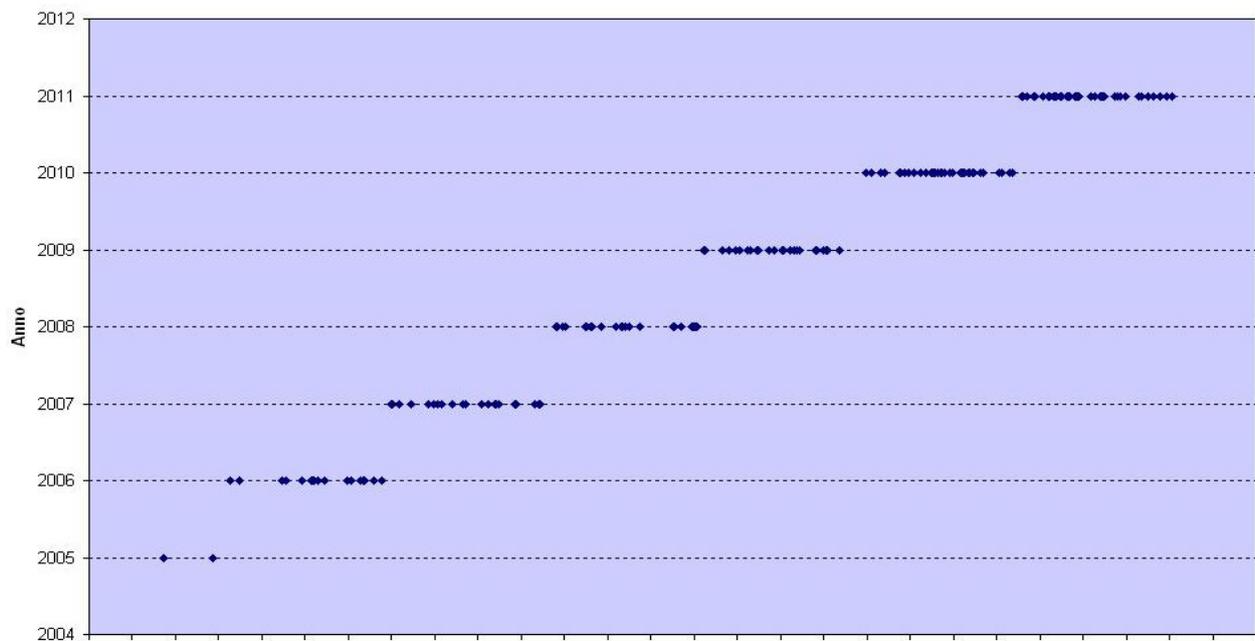
Figura 22. Distribuzione temporale del cluster epidemico ST 38 nel tempo.



In questo caso il campione è costituito dalle variabili aleatorie che contano il numero di casi riscontrati per anno e provincia, si è scelta come provincia di riferimento quella di residenza del paziente. L'ipotesi nulla è che le variabili che descrivono il numero di casi in ogni anno in ogni provincia è distribuito secondo una Poisson e che tempo e spazio sono indipendenti tra loro. Ciò significa che si ipotizza omogeneità nella distribuzione dei casi nello spazio e nel tempo; se si rigetta l'ipotesi nulla si ottiene quindi che in un determinato luogo e anno c'è stata una concentrazione di casi diversa. In particolare a noi interessa sapere se si può riscontrare

un'epidemia, cioè un aumento significativo nel numero di casi rilevati in un determinato luogo e anno; a tale scopo abbiamo scelto di utilizzare una statistica d'ordine basata sull'informazione relativa al massimo dei casi riscontrati. Le variabili che descrivono il numero di casi rilevati per anno e provincia sono 30 perché le province considerate sono dieci (Milano, Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Pavia, Varese, Lecco, Lodi, Monza e Brianza) e gli anni sono tre (dal 2009 al 2011, anni in cui i dati raccolti sono certamente completi affinché non ci siano ulteriori variabili che influiscano sull'analisi statistica (Figura 23)).

Figura 23. Distribuzione temporale dei casi.



Ad ogni variabile si può associare un peso dato dalla popolazione della provincia considerata nell'anno di riferimento; abbiamo ottenuto tali dati dalle tavole ISTAT, scegliendo il dato aggiornato al 31 dicembre di ciascun anno. Applicando questo secondo test possiamo concludere che l'ipotesi nulla è rigettata e che, quindi, la distribuzione "spazio-temporale" dei campioni non è omogenea e casuale. Da qui si può dedurre con certezza che nella provincia di Bergamo nel 2010 vi è stata un focolaio epidemico di listeriosi.

DISCUSSIONE

Attualmente esistono più di 250 patologie a trasmissione alimentare nel mondo, causate da molteplici agenti patogeni, alcuni dei quali si stanno sempre più diffondendo anche nei Paesi industrializzati a causa di numerosi fattori, tra cui l'incremento dei viaggi, con aumentati spostamenti di merci e persone, il crescente ricorso alla ristorazione collettiva, l'evoluzione dell'industria alimentare e il diffondersi di allevamenti intensivi.

I cambiamenti epidemiologici e demografici avvenuti in molte nazioni hanno favorito l'incremento della quota di soggetti particolarmente suscettibili alle malattie a trasmissione alimentare, tra cui anziani, immunodepressi e soggetti portatori di patologie croniche; per tutte queste ragioni le *foodborne disease* stanno sempre più diventando un notevole problema di sanità pubblica e costituiscono un'importante sfida per la salute globale. Da tutto ciò deriva la necessità di mantenere queste patologie, in particolari quelle che definiscono un quadro clinico piuttosto grave, sotto attenta sorveglianza, in un continuo sforzo di miglioramento dell'attuale sistema, al fine di esercitare un controllo sempre maggiore sulla diffusione di queste malattie e cercare di superare il problema della sottotifica, che rischia di sottostimare il reale impatto di queste malattie sulla salute globale (ISS, Epicentro, Tossinfezioni alimentari. Aspetti epidemiologici, www.epicentro.iss). In questo studio di ricerca sono state analizzate le caratteristiche della listeriosi nei due sistemi di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare Rete di Laboratorio e MAINF in Lombardia negli anni 2005-2012 (la Regione Lombardia è la più grande regione italiana con 1/6 del totale, circa 10 milioni di abitanti) per ottenere una valutazione globale della patologia e per colmare la lacuna informativa riguardo ad essa..

Listeria monocytogenes è stata riconosciuta negli anni '80 come importante agente di malattia a trasmissione alimentare; le moderne tecnologie di preparazione e di conservazione dei prodotti alimentari e in generale i cambiamenti a cui è andata incontro l'industria alimentare in questi ultimi anni hanno favorito l'emergenza di questa specie batterica, in grado di svilupparsi anche a basse

temperature. Nei Paesi industrializzati la listeriosi si sta sempre più affermando come notevole problema di sanità pubblica, sia per la potenziale gravità dell'infezione, sia per il fatto che epidemie si sono manifestate in anni recenti anche su vasta scala, soprattutto in seguito alla distribuzione di cibo contaminato attraverso le grandi catene di ristorazione, ponendo spesso problemi di identificazione delle epidemie a partire da casi in apparenza indipendenti, poiché lontani nello spazio e nel tempo, ed imponendo l'utilizzo di tecniche molecolari di tipizzazione e sub-tipizzazione per la ricostruzione dei cluster epidemici (ISS, Epicentro, Listeria. Aspetti epidemiologici, www.iss.epicentro.it). Oltre alla sua crescente diffusione sia in forma epidemica che sporadica, *L.monocytogenes* deve la propria rilevanza alla severità dei quadri clinici che è in grado di determinare nei soggetti a rischio, con una letalità della forma invasiva compresa tra il 24 e il 52% (CDC, National Centre for Zoonotic, Vectorborne and Enteric Diseases Listeriosis: general information, www.cdc.gov). Secondo i dati provenienti dai sistemi di sorveglianza MAINF e dalla Rete di Laboratorio si è assistito tra il 2005 e il 2012 in Lombardia ad un progressivo incremento dei casi di malattia e degli isolamenti di laboratorio di *L.monocytogenes*, passando da 26 casi di listeriosi nel 2005 (tasso di incidenza: 0,27/10⁵ abitanti) a 73 nel 2009 (tasso di incidenza: 0,71/10⁵ abitanti), e da 2 isolamenti di *Listeria* nel 2005 a 44 nel 2011 (la registrazione di 2 soli isolamenti di *L. monocytogenes* da parte del sistema di Laboratorio nel 2005 è motivata dal fatto che il sistema volontario ha iniziato le proprie registrazioni a metà del 2005, quindi mancano i dati relativi ai primi sei mesi dell'anno). Riteniamo che l'incremento di casi di listeriosi evidenziato sia reale in quanto non ci sono motivi per pensare che si sia alzata la sensibilità diagnostica dei laboratori ospedalieri della Regione Lombardia ed anche in considerazione che nello stesso periodo un analogo incremento è stato registrato dal sistema ufficiale di notifica dei casi. Tale osservazione è anche analoga a quelle riferite da diversi altri paesi europei (79) e riguarda soprattutto i casi non correlati con la gravidanza, mentre quelli associati alla gravidanza rimangono tutto sommato rari (12,5%). Dobbiamo anche precisare che il decremento che si evidenzia nel 2012 è dato, molto probabilmente, da una incompletezza di dati raccolti da entrambi i sistemi di sorveglianza, poiché la tempistica di

registrazione o invio dei casi non è tempestiva e probabilmente ancora incompleta per l'anno in corso.

Questo trend di crescita rispecchia la progressiva diffusione del patogeno verificatasi in questi ultimi anni, ma anche l'aumentato livello di sensibilità dei sistemi di sorveglianza in Lombardia; a questo proposito basti pensare che del totale di 89 casi registrati dal sistema delle notifiche in Italia nel 2007 (ultimo dato disponibile), oltre un terzo (33 casi) sono stati registrati in Lombardia dal sistema MAINF. Nello stesso anno sono stati rilevati in Europa in totale 1639 casi di listeriosi; l'Italia ha presentato un tasso di incidenza pari a $0,15/10^5$ abitanti, mentre i tassi di incidenza più elevati si sono avuti in Islanda ($1,3/10^5$ abitanti), Danimarca ($1,06/10^5$) e Norvegia ($1,05/10^5$) (25).

Dall'analisi dei tassi di incidenza di listeriosi per province è emerso che nel periodo esaminato i maggiori tassi di incidenza sono stati riportati per le province di Milano ($0,6/10^5$), Bergamo ($0,9/10^5$) e Lodi ($0,9/10^5$). L'elevata incidenza di listeriosi a Milano e Bergamo riflette la diffusione del patogeno nelle grandi aree metropolitane per la presenza di molteplici luoghi di ristorazione e punti vendita di grandi catene alimentari, ed anche per l'esistenza, tipica dei centri urbani importanti, di contesti di deprivazione socio-economica, che rappresentano substrati di suscettibilità alle infezioni.

Secondo quanto riportato dai due sistemi di sorveglianza, in linea con il dato europeo, la classe di età maggiormente colpita da listeriosi è stata quella oltre i 65 anni, seguita dalla classe 45-64 anni. I soggetti maggiormente suscettibili all'infezione da *L.monocytogenes* sono gli anziani, gli immunodepressi e i soggetti con patologie preesistenti, tra cui neoplasie, diabete, epatopatia cronica, insufficienza renale cronica e patologie polmonari croniche, soprattutto bronchite cronica ed enfisema polmonare. Alcuni recenti studi hanno evidenziato come fattori di rischio per listeriosi anche povertà e condizioni di emarginazione sociale, per la presenza di condizioni disagiate, per il maggior ricorso a discount e punti di ristorazione a basso costo, ed un minor rispetto delle norme igieniche e di sicurezza alimentare (80). Tra i fattori di rischio legati all'acquisizione dell'infezione il sistema della Rete di Laboratorio ha riportato anche la gravidanza, per l'esistenza di casi di listeriosi associati alla gravidanza, che possono esitare in aborto, prematurità, nascita di feto morto,

infezione amniotica ed infezione fetale o neonatale; secondo i dati dei CDC americani le donne in gravidanza sono 20 volte più suscettibili alla malattia. Tra i casi non *pregnancy-related* non sembra trascurabile la quota di quelli per i quali non sono segnalate sottostanti condizioni di rischio (10%); il dato è simile a quello riportato da Doorduyn et al in Olanda (81); questi autori, che hanno costruito due diversi studi basandosi su due diverse fonti informative, hanno documentato l'assenza di fattori di rischio nel 53 e nel 29% dei casi di listeriosi. Il riscontro di casi di listeriosi invasiva in soggetti adulti in buone condizioni di salute, suggerendo la responsabilità di stiptipi di *L.monocytogenes* caratterizzati da un'elevata virulenza, rappresenta forse un segnale di adattamento all'ospite umano della specie batterica e, di conseguenza, prospetta la possibilità che il ruolo giocato da *L.monocytogenes* nella patologia umana non sia esclusivamente inquadrabile nell'ambito delle infezioni opportunistiche; tale ipotetica e sfavorevole evoluzione sembra riguardare soprattutto i ceppi di sierotipo 4b, significativamente associato ad una maggiore letalità (17,3%); questa maggiore severità delle infezioni da stiptipi di sierotipo 4b nelle infezioni umane è in accordo con altri dati della letteratura e non necessariamente corrisponde ad una diversa prevalenza di contaminazione negli alimenti, ma piuttosto può essere conseguenza della maggiore virulenza del sierotipo (81).

Per quanto concerne la presentazione clinica, dai dati dei due sistemi è emerso, come atteso, che la maggior parte dei casi di listeriosi si è presentata in assenza di sintomatologia gastroenterica; il quadro clinico di più frequente riscontro è stato quello della meningite e della meningo-encefalite, in relazione allo spiccato tropismo del batterio per il Sistema Nervoso Centrale. A seguire si sono riscontrati quadri clinici di sepsi, polmonite, gastroenterite e listeriosi neonatale. La forma neonatale ha rappresentato un valore in casi decisamente più basso rispetto ai dati riportati in Letteratura, questo accade probabilmente per un errore di sottostima. La sottostima dell'incidenza delle forme di listeriosi *pregnancy related* può essere ricondotta a diversi fattori, tra cui l'estrema aspecificità delle manifestazioni cliniche, di carattere simil-influenzale, che pone problemi di identificazione dell'infezione, e la presenza di un'importante sottotifica, sia a causa del ridotto ricorso all'accertamento diagnostico anche in casi di forte sospetto clinico o di particolare severità, sia

perché spesso non vengono soddisfatti i criteri diagnostici per l'attuazione della notifica al sistema MAINF (i criteri attualmente in vigore considerano notificabili i casi di listeriosi materno-fetale e neonatale solo se il patogeno viene isolato da sito normalmente sterile, i casi in cui l'isolamento di *L.monocytogenes* viene effettuato da sito non sterile, pur in presenza di quadro clinico suggestivo, non sono considerati notificabili e pertanto non vengono inseriti nel sistema MAINF) (82). Da tutto ciò deriva la necessità di migliorare la sorveglianza della listeriosi nei reparti di ginecologia e ostetricia, attraverso l'avvio di inchieste epidemiologiche *ad hoc* ogniqualvolta sia necessario, la semplificazione della scheda di notifica ed non da ultimo la revisione dei criteri di notifica per le tutte le forme di listeriosi associate alla gravidanza.

Nonostante la severità delle manifestazioni da *L.monocytogenes* e l'elevata frequenza di malattia invasiva nei soggetti suscettibili, in metà dei casi l'evoluzione clinica è stata favorevole, mentre si è conclusa con il decesso del paziente nel 17% dei casi, registrando una letalità lievemente inferiore a quella riportata dai dati europei (20%).

Per quanto riguarda la valutazione dei sistemi di sorveglianza MAINF e Rete di Laboratorio possiamo dire che nel complesso i risultati mostrano che il sistema di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare in Regione Lombardia è in grado di fornire i dati microbiologici e clinici necessari per studiare l'epidemiologia delle infezioni di *L.monocytogenes* (e più in generale delle altre patologie trasmesse da alimenti), anche se è auspicabile un ulteriore miglioramento del sistema di sorveglianza, nella consapevolezza che non sia comunque possibile raggiungere un livello di sensibilità del 100% dei sistemi a causa dell'influenza esercitata da numerose variabili. Dall'analisi condotta è emersa molto chiaramente la complementarità dei due sistemi, i quali, essendo l'uno il sistema di registrazione degli isolamenti di laboratorio e l'altro il sistema delle notifiche obbligatorie, non possono in alcun modo coincidere, ma sono tra loro integrativi. Come atteso, la Rete di Laboratorio fornisce soprattutto dati microbiologici e molecolari mentre MAINF fornisce soprattutto dati di interesse clinico. I due sistemi di sorveglianza sono risultati dotati di un buon livello di rappresentatività per le malattie a trasmissione alimentare e hanno presentato un

soddisfacente grado di semplicità di utilizzo, requisito fondamentale per un sistema che punti ad essere il più possibile sensibile e tempestivo (83). L'analisi sulla qualità dei dati ha fatto emergere che il tasso di registrazione di listeriosi è aumentato negli ultimi cinque anni per entrambi i sistemi in modo parallelo con il medesimo andamento, con un aumento del tasso di registrazione di listeriosi del 17,8% per MAINF e del 560% per il sistema volontario. Il notevole incremento del tasso di Laboratorio ha ridotto il divario esistente con le notifiche MAINF, considerando che tra i due sistemi, MAINF è stato nel periodo di tempo esaminato quello più prossimo ai casi di malattia stimati, e che la Rete di Laboratorio ha presentato rispetto a MAINF una sottostima media di 20 casi. Anche se gli studi italiani sulla contaminazione ambientale e alimentare (84) sono del tutto sovrapponibili a quelli americani ed europei (85) e dimostrano una diffusa contaminazione da parte di *L.monocytogenes*, in base ai dati ufficiali notificati l'incidenza della malattia in Lombardia, ed ancor più a livello nazionale risulta minore di quella degli altri Paesi. L'incidenza media per gli anni dal 2005 al 2012 risulta di $0,18/10^5$ per la Lombardia, che notifica per la listeriosi in media il 55% del totale nazionale; l'incidenza italiana di listeriosi, nell'arco dello stesso periodo, risulta di $0,08/10^5$. Partendo dall'ipotesi che tale differenza sia dovuta a carenze delle fonti considerate, per ottenere una stima di quello che potrebbe essere il reale numero dei casi e la reale incidenza, è stato applicato il metodo cattura-ricattura. In base alla stima ottenuta dall'applicazione del metodo cattura-ricattura, l'incidenza della listeriosi osservata in Lombardia nel periodo esaminato ($0,75/10^5$) è più elevata di quella dichiarata, per lo stesso periodo, dalle fonti ufficiali del Ministero della Salute ($0,13/10^5$) (Tabella 9).

Tali dati, anche se regionali, sono inoltre in accordo con le incidenze di altri Paesi europei che da anni attuano precisi programmi di sorveglianza e che sono ritenuti in grado di osservare più del 90% dei casi reali (Tabella 9).

Tabella 9. Incidenza della listeriosi nei Paesi europei nel periodo 2005-2009 (Fonte: <http://ecdc.europa.eu>)

Paese	2005	2006	2007	2008	2009
Belgio	0,59	0,64	0,54	0,6	0,54
Danimarca	0,85	1,03	1,06	0,93	1,76
Francia	0,35	0,46	0,5	0,43	0,51
Germania	0,62	0,62	0,43	0,37	0,48
Grecia	0,07	0,06	0,09	0,01	0,04
Irlanda	0,29	0,17	0,49	0,3	0,22
Olanda	0,59	0,39	0,42	0,27	0,27
Regno Unito	0,37	0,35	0,43	0,34	0,38
Svezia	0,45	0,46	0,61	0,65	0,79
Italia	0,13	0,09	0,1	0,19	0,15

La listeriosi in Lombardia risulta un evento sporadico piuttosto che epidemico. Questo andamento epidemiologico, differente da quello di altre nazioni europee, potrebbe dipendere oltre che da carenze del sistema di sorveglianza, anche da differenze reali connesse con le tecniche agro-alimentari: posto che comunque è improbabile che gli eventi epidemici di dimensioni rilevanti possano sfuggire all'osservazione, si potrebbe ipotizzare che in Lombardia l'acquisizione della listeriosi attraverso alimenti contaminati sia più frequentemente correlata alla mancata osservanza di norme igieniche nella preparazione e nella conservazione in ambito di piccola distribuzione o a livello domestico. A conferma di tale ipotesi, ricordiamo che l'epidemia accertata e rilevata dal nostro studio si è verosimilmente verificata per la moltiplicazione di *L.monocytogenes* in alimenti preparati tempo prima del consumo e non correttamente conservati, piuttosto che per l'utilizzo di un prodotto contaminato all'origine. Al contrario, negli episodi epidemici descritti in Paesi come la Francia, sono stati spesso identificati quali veicoli alimentari, dei prodotti contaminati a monte della distribuzione commerciale e poi ritirati dalla vendita.

Altre differenze nelle abitudini alimentari italiane, come la meno diffusa abitudine di consumare un pasto principale fuori casa o l'utilizzo di piatti ready to eat, possono invece in parte spiegare il basso numero di casi, sia sporadici che epidemici, che si riscontrano nelle Regioni del Centro e

del Sud Italia, dove la bassa incidenza (incidenza media $0,022/10^5$) osservata della listeriosi non è probabilmente spiegabile solamente attraverso una sottostima delle fonti che registrano i casi di malattia. Le differenze in tema di abitudini alimentari sono poco o per nulla significative in Lombardia che, da questo punto di vista, è più simile ai Paesi centro-europei che al Sud dell'Italia; quindi, la bassa incidenza della listeriosi osservata in Lombardia è attribuibile ad una sottostima delle fonti informative, così come dimostrato dai risultati dell'applicazione del metodo cattura-ricattura che ci hanno consentito di stimare una incidenza prossima a quella dei paesi industrializzati

Nonostante i buoni risultati ottenuti negli ultimi anni dal sistema di sorveglianza lombardo, è necessario incrementare ulteriormente il tasso di registrazione dei due sistemi per avvicinarsi sempre più ai target ottimali; calcolando i casi stimati di malattia tramite metodo cattura-ricattura è risultato un gap medio tra MAINF e casi stimati di 25 e tra Rete di Laboratorio e casi stimati di 42 per listeriosi. Tra il 2005 e il 2012 i casi di listeriosi osservati dai due sistemi sono risultati il 35% in meno rispetto ai casi reali di listeriosi, sempre stimati con metodo cattura-ricattura.

Il livello di concordanza dei due sistemi è risultato molto limitato, con una media di nominativi coincidenti del 150% inferiore rispetto ai non coincidenti. Per comprendere il motivo di un così ridotto livello di concordanza tra i due sistemi di sorveglianza è stata condotta un'analisi più approfondita dei due database registranti i dati della listeriosi del 2012 per valutare se vi fossero differenze di registrazione tra i due sistemi tra individui ospedalizzati e non, diverse classi di età e province lombarde. Dall'analisi è emerso che non vi sono differenze di registrazione significative tra i due sistemi per quanto concerne soggetti appartenenti a diverse classi di età: i sistemi registrano la medesima proporzione di bambini, adulti e anziani. Sono invece emerse differenze di registrazione in merito a soggetti ospedalizzati e non, e a livello territoriale tra province diverse. Per quanto concerne le province, è stato constatato che non tutte le province inviano segnalazioni alla Rete di Laboratorio e a MAINF allo stesso modo: Mantova, ad esempio, notifica attualmente solo a MAINF (25% delle notifiche totali, 0% delle segnalazioni

Laboratorio). Si ritiene che le differenze topografiche nella provenienza delle segnalazioni sia alla base del carente livello di sovrapposizione tra i due sistemi di sorveglianza, che condiziona negativamente la sensibilità dei sistemi. I problemi organizzativi presenti a livello locale influenzano maggiormente il sistema di Laboratorio, per il quale, le segnalazioni vengono effettuate su base volontaria.

Una criticità ancora presente è invece rappresentata dalla completezza dei campi informativi dei due sistemi, che dall'analisi condotta è risultata nel complesso insoddisfacente, con percentuali ancora eccessivamente elevate di dati non noti. I campi che in assoluto sono risultati più incompleti sono Alimenti, Viaggi ed Ospedalizzazione, con percentuali di dati non noti sempre superiori all'80% dei casi. La riorganizzazione del sistema di Laboratorio ha condotto ad un decisivo miglioramento in termini di sensibilità, tempestività e rappresentatività, ma non ha prodotto importanti miglioramenti per quanto concerne la completezza delle informazioni; un maggiore grado di completezza del sistema può essere ottenuto attraverso la semplificazione delle schede di segnalazione, facendo in modo che in ciascuna scheda vengano richieste solo le informazioni che non vengono raccolte dall'altro sistema, per evitare perdite di tempo legate alla compilazione di moduli eccessivamente lunghi e complessi. Anche il sistema MAINF, il quale si è distinto negli anni per buoni livelli di sensibilità e tempestività, non presenta un grado di completezza soddisfacente. Il problema, più che a mancata compilazione dei campi, sembra essere dovuto alla mancanza effettiva delle informazioni, che nella maggior parte dei casi risultano essere non conosciute, a scapito di una maggiore conoscenza di variabili epidemiologiche, come Viaggi ed Alimenti, di grande importanza per la descrizione delle *foodborne disease* (86). I caratteri di complementarietà e di reciproca integrazione posseduti dai due sistemi di sorveglianza non consentono di farli coincidere o confluire in un unico sistema; è invece necessario, mantenendo i due sistemi indipendenti, potenziarne sempre di più il collegamento, al fine di integrare le informazioni per una più completa descrizione delle caratteristiche epidemiologiche delle malattie e dei loro cambiamenti nel tempo. Per migliorare

la sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare è necessario puntare sul rafforzamento del link tra Rete di Laboratorio e MAINF che, oltre ad aumentare la sensibilità di registrazione dei casi di malattia, consente di integrare i dati di laboratorio e le informazioni cliniche, permettendo una più ampia conoscenza dei patogeni. Introdurre nuovi assetti organizzativi, che sappiano rispondere alle necessità del momento, può essere un modo per migliorare i sistemi di sorveglianza esistenti; a questo proposito un netto incremento qualitativo è già stato ottenuto dal sistema di Laboratori dall'inizio del 2009 a seguito di una riorganizzazione, che ha puntato sull'individuazione di laboratori di riferimento per le ASL e su un più sistematico raccordo tra queste e il centro regionale. La riorganizzazione delle competenze a livello territoriale, una maggiore responsabilizzazione delle strutture locali, anche attraverso una maggiore formazione degli operatori, ed una maggiore connessione con il centro di coordinamento sono misure che possono essere messe in atto per implementare l'efficienza dei sistemi e delle reti di sorveglianza (87). Un punto cruciale del miglioramento dei sistemi di sorveglianza consiste nell'incentivare il ritorno informativo, facendo comprendere alla collettività l'importanza di fare pervenire i dati raccolti a coloro che si occupano di sorveglianza, in modo da intraprendere le misure adeguate al controllo delle malattie, ma tutto questo non può prescindere da una progressiva semplificazione delle procedure e della modulistica, e da un sostanziale miglioramento degli aspetti organizzativi dei sistemi (88). La sorveglianza basata sulla Rete di Laboratorio dovrebbe quindi contribuire a colmare ed integrare i limiti del sistema delle notifiche, senza sovrapporre le informazioni. A questo proposito è anche necessario individuare di volta in volta le priorità della sorveglianza, in modo da indirizzare i sistemi verso contesti specifici. In tema di malattie a trasmissione alimentare, per rafforzare l'attuale sistema è molto importante potenziare il link con la rete veterinaria e avvalersi anche dei dati forniti dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, che in Italia rappresentano una rete ben organizzata in grado di fornire dati sulla circolazione degli agenti di *foodborne disease* nel serbatoio animale. Il link tra il sistema di Laboratorio e la rete veterinaria Enter-Vet, istituita nel 2002, rappresenta un punto cruciale per una maggiore

conoscenza ed una maggiore possibilità di controllo di tutte le zoonosi, e tutto ciò può essere ottenuto attraverso l'analisi integrata dei dati relativi ai campioni umani e ai campioni di origine animale, secondo il principio della interdisciplinarietà dello studio delle malattie a trasmissione alimentare (89).

E' anche necessario procedere, secondo le indicazioni fornite da WHO ed ECDC, al potenziamento delle reti di sorveglianza a livello locale, nazionale ed internazionale, in modo da rafforzare il legame tra enti locali, tutti afferenti ad un comune coordinamento. Questa organizzazione può garantire il continuo scambio di dati epidemiologici tra centri siti a distanza, oltre al riconoscimento di epidemie su vasta scala e la creazione di piani di intervento comune per fronteggiare anche gli eventi di rilevanza internazionale (90). Proprio per riconoscere epidemie su vasta scala ed identificarne con precisione i veicoli sono state introdotte tecniche di tipizzazione e sub-tipizzazione molecolare tra cui la PFGE, facenti riferimento alla rete Pulse-Net International, che rappresenta una nuova frontiera nella sorveglianza delle patologie trasmesse da alimenti, e che vale la pena di estendere e potenziare negli anni futuri (91).

Un'efficace sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare può infine fornire i giusti orientamenti per l'attuazione delle misure di prevenzione e controllo delle malattie, prime tra tutte le procedure di sicurezza alimentare e la rigorosa applicazione dei protocolli di igiene degli alimenti (tra cui il protocollo HACCP), supportati da una legislazione in tema di sicurezza alimentare che sia al passo con i tempi.

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche si può notare che: la sierotipia ha un limitato potere discriminante (nella nostra casistica i tre sierotipi più frequenti 1/2a, 1/2b e 4b coprono 98,5% degli isolati), non rappresenta comunque uno strumento sufficiente per definire e distinguere, soprattutto ai fini epidemiologici, i "tipi" di *L. monocytogenes* implicati nei casi clinici e deve essere combinata con altre tecniche molecolari, come sottolineato dalla review di Dongyou Liu (2006) (81). Dai risultati della sierotipia possiamo notare come il sierotipo 1/2a sia, oltre che il più diffuso, in continuo aumento rispetto agli altri sierotipi con andamento più costante.

Al contrario le tecniche di biologia molecolare hanno portato a buoni risultati essendo caratterizzate da un elevato potere discriminatorio. Nel nostro studio l'applicazione di diverse tecniche di genotipizzazione ha permesso di caratterizzare i ceppi raccolti documentandone un notevole grado di eterogeneità: la PFGE e la MLST hanno permesso il riconoscimento di cluster con un elevato grado di accordo tra le due tecniche. L'elaborazione dei dati (BioNumerics) ha consentito il riconoscimento di 15 cluster (cioè insieme di ceppi con una omologia > 80%) .

Il riscontro di un'ampia variabilità degli isolati era già stata osservata anche da altri autori, sia nel nostro che in altri Paesi (92).

I diversi "genotipi" identificati comprendono da 2 a 39 isolati clinici. Tra tutti merita particolare attenzione il tipo Cluster 14 ST 38 che è risultato presente negli anni 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011. Dall'analisi statistica la distribuzione osservata risulta inspiegabile in un caso di non-epidemia; inoltre, il genotipo 38 non solo non è molto frequente nella banca dati internazionale dell'Istituto Pasteur consultabile online, ma in base all'esperienza dei laboratori degli Istituti zooprofilattici sperimentale a cui abbiamo chiesto informazioni, nell'archivio relativo agli isolati non umani, è stato identificato solo in un caso da un campione di formaggio "gorgonzola" che rappresenta una tipica produzione della Regione Lombardia. Come dimostrato dall'analisi statistica, gli stipti di sierotipo 1/2a appartenenti al clone 38 ed al pulsotipo 14 sono parte di un evento epidemico, anche se, in base alla letteratura, le epidemie sono state più frequentemente associate al sierotipo 4b (93). L'analisi statistica confuta l'ipotesi nulla che i campioni siano distribuiti nello spazio e nel tempo in modo omogeneo. Abbiamo dimostrato mediante l'ausilio di programmi informatici che nel 2010 nella provincia di Bergamo la distribuzione dei casi non è casuale e, quindi, c'è stata evidentemente un epidemia di listeriosi. Complessivamente, dai dati che sono stati raccolti, anche incrociando il nostro database con quello del sistema basato sulle notifiche, nessuno dei casi inclusi nel nostro studio è stato riferito come appartenente ad un evento epidemico. Diversi sono i motivi che rendono difficile il riconoscimento di focolai epidemici di listeriosi: il lungo periodo di incubazione, l'associazione con alimenti che prodotti come *ready-to-eat* possono

comunque essere consumati in tempi molto variabili, il ruolo delle condizioni di salute del consumatore che fanno sì che la sintomatologia possa insorgere in un ampio intervallo di tempo e solo in una piccola frazione dei soggetti esposti al consumo di uno stesso alimento contaminato.

La relazione tra “tipi” identificati e condizioni cliniche conferma, come già detto, che le persone immunodepresse siano la classe di persone maggiormente infette e permette interessanti osservazioni soprattutto per quanto riguarda i casi di listeriosi *pregnancy-related*. Infatti nel gruppo dei casi correlati con la gravidanza, che rappresenta comunque una condizione fisiologica anche se caratterizzata da una certa riduzione dell’immunocompetenza materna, i “tipi” implicati sono 13; il profilo dei *pregnancy-related* si riscontra nei casi senza fattori di rischio e anche in quelli con fattori di rischio, questo significa che non vi è un particolare ceppo aggressivo con caratteristiche particolari, ma piuttosto l’infezione dipende dallo stato di salute della persona e dal grado di contaminazione e dall’igiene dell’alimento.

BIBLIOGRAFIA

1. Murray PR, Baron , Pfaller RA, Manual of Clinical Microbiology, ASMpress 6th edition, 341-347.
2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Williams&Wilkins, 1235-1245.
3. Gray MJ, Frejtag NE, Boor KJ, How the bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr.Jekyll to Pathogenic Mr.Hide, Infection and immunity, 2006 May, 74 (5): 2505-2512.
4. Gandhi M, Chikindas ML, Listeria: a foodborne pathogen that know how to survive, International Journal of Food Microbiology, 2006, doi:10.1016/J.ijfoodmicro.2006.07.008.
5. Fenlon DR, *Listeria monocytogenes* in natura environmental, NewYork: Mercel Dekker Inc.1999: 21-37.
6. Wesley IV, Ryser ET, Marth EH Listeriosis in animals. Listeria, listeriosis and food safety, Second edition, revised and expanded pag.39.
7. Ooi ST, Lorber B, Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*, Clinical Infectious Disease; 40 (9): 1327-1332.
8. Grif K, Pascheider G, Dierich MP, Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one year prospective stool survey, European Journal of clinical Microbiology and infectious disease; 22 (1): 16-20, DOI: 10.1007/s 10096-002-0835-9.
9. Lionau A, Sofos JN, A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat products in retail and food service environments; Journal of Food Protection, 2007; 70 (9):2172-2198.
10. Todd ECD, Notermquans S, Surveillance of Listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes* Food control, 2010 DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.07.021.
11. Gianfranceschi M, Gattuso A, Tartaro S, Aureli P, Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990-1999: serotype distribution in food environmental and clinical samples Europe Journal of Epidemiology, 2003; (18,19): 1001-1006.
12. ISS Epicentro, il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica Tossinfezioni alimentare <http://www.epicentro.ISS.it/problemi/tossinfezioni.asp>.
13. Scallan E, Hoekstra RM, Augelo FJ, Tauxe R, Widdowson MA, Rosi SL, Jones GL, Griffin PM, Foodborne illness acquired in the United States major pathogens, 2011, Jan; 17(1) <http://www.nc.cdc.gov/eid/article/17/1/pdfs/09-1101pl.pdf>.
14. CDC Estimates of foodborne illness in the United State 1996-2010; <http://www.cdc.gov/foodborneburden/trends-in-foodborne-ilness.html>.

15. Scientific Report of Efsa The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2009; www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm.
16. Ministero, Autocontrollo e HACCP, www.salute.gov.it/sicurezzaAlimentare.
17. Ministero, Autocontrollo e HACCP, www.salute.gov.it/sicurezzaAlimentare.
18. EFSA, Tossinfezioni alimentari, www.efsa.europa.eu.
19. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari, www.eur-lex.europa.eu.
20. Mook P, O'Bryen SY, Gillespie IA, Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009, *Emerg.Infect.Dis.* 2011 Jan; 17 (1):38/43.
21. Goulet V, DeValk H, Pierre O, Stainer F, Rocourt J, Vaillant V, Jeaquet C, Desenclos YC, Effect of Prevention Measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997 *Emerging Infectious disease* 2001 Nov; 7 (6): 983-989.
22. Goulet V, Hedberg C, Le Monier A, DeValk H, Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries, *Emerg.Infect.Dis.* 2008, May; 14 (5): 734-740.
23. Gillespie IA, McLaucin J, Grent KA, Little CL, Mithani V, Penman C, Lane C, Regan M, Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001-2004, *Emerg.Infect.Dis.* 2006; Sept.; 12 (9): 1361-1365.
24. Gianfranceschi MV, Gattuso A, Dottavio MC, Fokas S, Aureli P, Results of a 12-months enhanced surveillance of listeriosis in Italy, *Eurosurveillance*, 2007, Nov; 12 (11): <http://www.eurosurveillance.org/viewArticle.aspx?ArticleId=746>.
25. ECDC Annual epidemiological report on communicable disease 2010 Surveillance Report: Listeriosis http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011_sur_Annua_epidemiological_report_on_communicable_diseases_in_Europe.pdf pag.84.
26. Mook P, Grent KA, Little CL, Kafatos G, Gillespie IA, Emergence of pregnancy-related listeriosis amongst ethnic minorities in England and Wales, *Eurosurveillance*, 2010; 15(27): pii=19610 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19610>.
27. Linnam MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura ML, Hayes P, Weaver R, Audurier A, Plicaytis BD, Fannin SL, Kleks A, Broome CV, Epidemic Listeriosis associated with mexican-style cheese, *Engl J Med* 1988; 319: 823-828.
28. Hunag JT, Liao CH, Yong CJ, teng Lj, Wang YT, Hsue PR, Listeriosis Taiwan 1996-2008, *Emerging Inf. Diseases* 2001 Sept; 17(9): 1731-1733.
29. Ross D.S., Jones J., Lynch MF. Toxoplasmosis, cytomegalovirus, Listeriosis and preconception caea. *Maternal Child Health J.*, 2006; 10: s187-s191.

30. Jamieson D, Theiler R, Rasmussen S. Emerging infection and pregnancy. CDC EID J, 2006;12(11).
31. Gupta V, Gautam V, Mehta N, Kumari I, Joshi R. Listeriosis in second trimestre of pregnancy: casa report from India. Jpn J Infect Dis, 2003;56:60-61.
32. Goldenberg RL, Thompson C. The infectious origin of stillbirth. Am J Obstet Gynecol, 2003;189:861-873.
33. Buchholz U., L. Mascola. Transmission, Pathogenesis, and Epidemiology of *Listeria monocytogenes*. Infectious Disease in Clinical Practice, 2001;10:34-41.
34. Braden C. Listeriosis. Pediatric infect Dis J. 2003; 22:745-746.
35. Rizzo C, Coscia M, Ceci G, Monno R, De Vito D. Listeriosis pregnancy and subsequent abortion: a case report. GIMMOC, 2004;8:153-156.
36. Bakardjiev A, Theriot J, Portnoy D. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. Plos Pathogens, 2006;2:623-631.
37. Le Monnier A., Join-Lambert O., Jaubert F. Invasion of placenta during murine listeriosis. Infect and immun, 2006;663-672.
38. Posfay Barbe Klara M., Wald E.R. Infectious disease: Listeriosis. Pediatrics in Reviuw, 2004;25:5:151-159.
39. Siegman-Igra Y., Levin R., Weinberger M., Golan Y., Schwartz D. And Co. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. Emerging Infectious Disease, 2002;8:305-310.
40. Mylonakis E., Paliou M., Hohmann E. et al. Listeriosis during pregnancy: a casa series end rewiw of 222 casasa. Medicine 2002;81:260-269.
41. Lorber B. Listeriosis. Clin infect Dis. 1997;24:1-9.
42. Roberts A.J., Wiedmann M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. Cell. Mol. Life Sci. 2003;60:904-918.
43. Rocourt J, Jacquet C, Reilly A. Epidemiology of human listeriosis and saefoods. International J Food Microbiol 2000;62:197-209.
44. Deeks SL, MacDonald DM, Medaglia A. Bacterial Meningitis in Canada: hospitalization 1994-2001. CCDR, Public Health Agency of Canada, 2005;31.
45. Posfay Barbe Klara M., Wald E.R. Infectious disease: Listeriosis. Pediatrics in Reviuw, 2004;25:5:151-159.
46. Toyoshima M, Apanavicius A, Soeiro A, Almeida G. *Listeria monocytogenes* in cirrhotic patients: first description in Brazil. Rev Inst Med Trop S.Paulo, 2006;48:291-293.

47. Aureli P, Fiorucci GC, Cairoli D, et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N Engl J Med 2000; 342:1236-1241.
48. Doganay M. Listeriosis: clinical presentation. Immun Med Microbiol, 2003; 35:173-175.
49. Janakirman V. , Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment and prevention, Reviews in obstetrics and gynecology 2008; 1 (4):179-185.
50. La Placa, Principi di microbiologia 10° edizione Società editrice Esculapio pag. 386-399.
51. CDC What is PulseNet? <http://www.cdc.gov/pulsenet/whatis.htm>.
52. Buchholz U., L. Mascola. Transmission, Pathogenesis, and Epidemiology of *Listeria monocytogenes*. Infectious Disease in Clinical Practice, 2001;10:34-41.
53. Toyoshima M, Apanavicius A, Soeiro A, Almeida G. *Listeria monocytogenes* in cirrhotic patients: first description in Brazil. Rev Inst Med Trop S.Paulo,2006;48:291-293.
54. CFSAN-FDA-HHS/FSIS-USDA. Draft assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods.
55. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Wehland J, Kref J; *Listeria* pathogenesis and virulence determinants; Clin Microbiol Rev. 2001 July; 14(3): 584-640.
56. Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J; Harrison's principles of internal medicine 17th edition McGraw Hill pg. 378-385.
57. Goulet V, Jacquet C, Martin P, Vaillant V, Laurent E, De Valk H. Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. Euro Surveill. 2006;11(6):79-81.
58. Bille J, Blanc DS, Schmid H, Boubaker K, Baumgartner A, Siegrist HH, et.al. Tomme (soft cheese) related outbreak of human Listeriosis in North-Western Switzerland. Euro Surveill. 2006;11(6):91-3.
59. Gianfranceschi M, Gattuso A, Tartaro S, Aureli P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples in Italy between 1990 and 1999: serotype distribution in food, environmental and clinical samples. Euro J Epidemiol 2003;18:1001-1006.
60. De Valk H, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, Perra A, Simon F, Desenclos JC, Martin P. Surveillance of *Listeria* infections in Europe. Euro Surveill. 2005;10(10):251-255.
61. Latorre L, Parisi A, Fracalvieri R, Normanno G, Nardella M, Goffredo E, Palazzo L. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in food from Italy. J Food Protect,2007;70(6):1507-1512.
62. Pontello M, Guaita A, Sala G, Cipolla M, Gattuso A, Sonnessa M, Gianfranceschi MV; *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections in Italy, 2000-2010; Ann Ist Super Sanità; 2012; 48(2):146-50.

63. Hook E, Albright SG, Cross PK, Use of Bernoulli census and log-linear methods for estimating the prevalence of spina bifida in livebirths and the completeness of vital record reports in New York State. *Am J Epidemiol*, 1980;112:750-58.
64. Frischer M., Leyland A. e Cormark R. Estimating the population prevalence of injection drug use and infection with human immunodeficiency virus among injection drug users in Glasgow, Scotland. *Am J Epidemiol*,1993;138:170-181.
65. Jansson A, Arneborn M, Ekdahal K. Sensitivity of the Swedish statutory surveillance system for communicable diseases 1998-2002, assessed by the capture-recapture method. *Epidemiol Infect*, 2005;133:401-407.
66. Gallo U, Bano F, Cocchio M, Carniel L, Cesaro K, Giron M, Stima della prevalenza della popolazione portatrice di patologie croniche mediante il metodo “cattura-ricattura”: l’esempio del diabete mellito. *Giornale Italiano di Farmacia Clinica*,2005; 378-386.
67. Gatto M, 2006; International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting, 1995.
68. Chapman CJ. Some properties of the hypergeometric distribution with applications to zoonotical census. *U California Public Stat*, 1951;1:131-160.
69. Gatto M, Casagrandi R. Metodo di cattura-marcatura-ricattura. Corso di ecologia, 2006.
70. Ueda F, Sugamata M, Aota M, Mochizuki M, Yamada F, Hondo R. Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains. *New Microbiol*. 2002 Apr; 25(2): 165-71.
71. Ramaswamy V.e Co. *Listeria*. *J. Microbiol Immunol Infect*, 2007;40:4-13.
72. Gilbreth S. E.,Call J.E., Wallace M. Scott V. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat and listeriosis patients in the United States. *Applied and environmental microbiology*, 2005;8115-8122.
73. Lin M., Todoric D., Mallory M., Luo S., Trottier E., Dan H. Monoclonal antibodies binding to the cell surface of *L. monocytogenes* serotype 4b. *J. Med. Microbiol*, 2006;55:291-299.
74. He DM, Deng F, Wang HM, Ke CW, Yan JW, Zhu HM, Lai WD, Song MD, Yang B, Wang HY, Wang J, Cong M, Ke BX, Deng XL, Ni HZ; Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from foodstuff in Guangdong province by pulsed-field gel electrophoresis; *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*; 2008 Jan; 29(1):38-43.
75. Maiden, MC.; Bygraves, JA.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, JE.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J. et al. (Mar 1998); Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms; *ProcNatlAcad Sci USA* 95(6): 3140–3145.
76. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution; *PLoS Pathog*; 2008;4(9): e1000146.
77. Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de la Fuente L, Vázquez JA. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):757-62.

78. M.Fromont, B.Laurent, P.Reynaud-Bouret. Adaptive tests of homogeneity for a Poisson process. *Annales de l'Institut Henri Poincare, Probabilites et Statistiques*, 47 issue 1, pp.176-213, 2011.
79. P. Muñoz, L. Rojas, E. Bunsow, E. Saez, L. Sanchez-Cambronero, L. Alcal, M. Rodriguez-Creixems, E. Bouza; Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly. *Journal of Infection* 2012; 64:19-33.
80. A. Gillespie, P. Mook, C. L. Little, K. A. Grant, J. McLauchlin. Human listeriosis in England, 2001-2007: association with neighbourhood deprivation, *Eurosurveillance*; 2010.
81. Dongyou Liu. Identification, subtyping and virulence determination of *L.monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006; 55: 645-649.
82. CDC, K. A. Jackson, M. Iwamoto, D. Swerdlow. *Pregnancy-associated listeriosis*; Cambridge Univerasity Press, February 2010.
83. CDC, Robert R. German, Lisa M. Lee, John M. Horan, Robert L. Milstein, Carol A. Pertowski, Michael N. Waller Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems *MMWR, Recommendations and Reports*; 7 Maggio, 2004.
84. De Cesare A., Manfreda G., Macri M.,Cantoni C. Application of automated rybotyping to support the evaluation of *Listeria monocytogenes* sources in a Taleggio cheese producin plant. *Food Protection J.*, 2007;70:1116-1121.
85. (U.S. Food and Drug Administration. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of RTE foods. FDA 2006.
86. M. J. Leslie, J. H. Mcquiston *Surveillance for zoonotic diseases*; June 2007.
87. M. Pontello, Dipartimento di Sanità pubblica, Microbiologia, Virologia – Università degli Studi di Milano; *La sorveglianza delle salmonellosi in Lombardia*; 2009.
88. G. Krause, J. Benzler, G. Reiprich, R. Gorgen. Improvement of a national public health surveillance system through use of a quality circle; *Eurosurveillance*: Vol. 11, Issue 11, 01 Nov.2006.
89. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Università degli Studi di Bologna. F. Ostanello *Sistemi di sorveglianza delle zoonosi: un approccio integrato tra medici e veterinari*.
90. ECDC, *Surveillance of Communicable Diseases in the European Union. A long term strategy: 2008-2013*.
91. B. Swaminathan, T. J. Barrett, S. B. Hunter, R. V. Tauxe. *CDC PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States*; 2001.
92. Gianfranceschi MV, D'Ottavio MC, Gattuso A, Bella A, Aureli P .Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005) . *Food Microbiology* 2009;26: 520-526.

93. Kathariou *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenesis, a food safety perspective. J Food Prot. 2002; 65: 1811-1829.

ALLEGATI

Allegato A.

Protocollo ufficiale PFGE del sistema Pulse-Net.

One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol or molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PREPARATION OF PFGE PLUGS FROM AGAR CULTURES

Day 0

Streak an isolated colony from test cultures onto Brain Heart Infusion Agar (BHIA) plates for confluent growth. It is recommended that a storage vial of each culture be created. To do this stab small screw cap tubes of TSA, HIA, or similar medium with the same inoculating loop used to streak the plate. This will ensure that the same colony can be retested if necessary. Incubate cultures at 37°C for 14-18 h.

Day 1

1. Turn on shaker water bath or incubator (54-55°C), stationary water baths (55- 60°C) and spectrophotometer (or equivalent instrument such as the Dade Microscan Turbidity meter or bioMérieux Vitek colorimeter).

2. Prepare TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) as follows:

10 ml of 1 M Tris, pH 8.0

2 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.0

Dilute to 1000 ml with sterile Ultrapure water (Clinical Laboratory Reagent Water (CLRW))

Prepare Lysozyme (Sigma L7651 or equivalent) stock solution (20 mg/mL in TE) as follows:

Weigh out 100 mg Lysozyme (keep the container of Lysozyme on ice)

Add 5 mL TE buffer, swirl to mix

3. Aliquot 250 µL amounts into small eppendorf tubes and freeze for future use.

4. Prepare 1% SeaKem Gold agarose + 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) for PFGE plugs as follows:

a. Place 20% SDS stock solution (GibcoBRL #15553-035) into 55- 60°C water bath to warm.

b. Weigh 0.50 g (or 0.25 g) SeaKem Gold (SKG) agarose into 250 ml screw-cap flask.

c. Add 50.0 ml (or 25.0 ml) TE Buffer; swirl gently to disperse agarose.

d. Loosen or remove cap and cover loosely with clear film, and microwave for 30-sec; mix gently and repeat for 10-sec intervals until agarose is completely dissolved.

e. Add 2.5mL (or 1.25mL) of warm 20% SDS stock solution, swirl to mix.

f. Recap flask and return to 55- 60°C water bath and equilibrate the agarose in the water bath for 15 minutes or until ready to use.

SAFETY WARNING: Use heat-resistant gloves when handling hot flasks after microwaving.

Note: SeaKem Gold agarose works well for making PFGE plugs because it provides added strength to the plugs minimizing breakage of plugs during the lysis and washing steps. The time and temperature needed to completely dissolve the agarose is dependent on the specifications of the microwave used, and will have to be determined empirically in each laboratory.

5. Label small tubes (12-mm x 75-mm Falcon tubes or equivalent) with culture numbers.

6. Transfer 2 ml of TE Buffer to small labeled tubes. Use a sterile polyester-fiber or cotton swab that has been moistened with sterile TE to remove some of the growth from the agar plate; suspend cells in TE by spinning swab gently so cells will be evenly dispersed and formation of aerosols is minimized.

7. Adjust concentration of cell suspensions to one of values given below by diluting with sterile TE or by adding additional cells.

- a. Spectrophotometer: 610 nm wavelength, absorbance (Optical Density) of 1.00 (range of 0.8-1.0)
 - b. Dade Microscan Turbidity Meter: 0.40 - 0.45 (measured in Falcon 2054 tubes)
 - c. bioMérieux Vitek colorimeter: \approx 17-18% transmittance (measured in Falcon 2054 tubes)
- Note: The values in Steps 7a, 7b and 7c give satisfactory results at CDC; if different instruments or tubes are used, each laboratory may need to establish the optimal concentration needed for satisfactory results.

CASTING PLUGS

Label wells of PFGE plug molds with culture number. When reusable plug molds are used, put strip of tape on lower part of reusable plug mold before labeling wells.

Note 1: Unused plug agarose can be kept at room temperature and reused 1-2 times. Microwave on low-medium power for 10 -15 sec and mix; repeat for 5 -10 sec intervals until agarose is completely melted. This agarose melts rapidly.

Note 2: Proteinase K solutions (20 mg/ml) are available commercially. Alternatively, a stock solution of Proteinase K can be prepared from the powder in sterile Ultrapure water (CLRW). For best results, aliquot in 300-500 μ l into small tubes and store in a freezer (-20 °C) until ready to use. Just before use, thaw appropriate number of vials needed for the samples; keep Proteinase K solutions on ice. If the Proteinase K stock solution was prepared from powder, discard any thawed solution at the end of work day. Store commercially prepared Proteinase K solutions according to directions provided by the supplier.

1. Transfer 400 μ l (0.4 ml) adjusted cell suspensions to labeled 1.5-ml microcentrifuge tubes.
2. Add 20 μ L thawed Lysozyme stock solution (20 mg/mL) to each tube and mix gently. Place tubes into a 55-60°C water bath for 10-20 minutes. Discard unused thawed Lysozyme solution.
3. Add 20 μ l of Proteinase K (20 mg/ml stock) to each tube and mix gently with pipet tip. (200 μ l are needed for 10 cell suspensions.)
4. Add 400 μ l (0.4 ml) melted 1% SeaKem Gold agarose to the 0.4-ml cell suspension; mix by gently pipetting mixture up and down a few times. Maintain temperature of melted agarose by keeping flask in beaker of warm water (55-60°C).
5. Immediately, dispense part of mixture into appropriate well(s) of reusable plug mold. Do not allow bubbles to form. Two plugs of each sample can be made from these amounts of cell suspension and agarose and are useful if repeat testing is required. Allow plugs to solidify at room temperature for 10-15 min. They can also be placed in the refrigerator (4°C) for 5 minutes.

LYSIS OF CELLS IN AGAROSE PLUGS

1. Label 50-ml polypropylene screw-cap or 50-ml Oak Ridge tubes with culture numbers.
2. Prepare Cell Lysis Buffer (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) as follows:
25 ml of 1 M Tris, pH 8.0
50 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.0
50 ml of 10 % Sarcosyl (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt)
Dilute to 500 ml with sterile Ultrapure water (CLRW)
3. Calculate the total volume of Cell Lysis/Proteinase K Buffer needed as follows:
 - a. 5 ml Cell Lysis Buffer (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) is needed per tube (e. g., 5 ml x 10 tubes = 50 ml).
 - b. 25 μ l Proteinase K stock solution (20 mg/ml) is needed per tube of the cell lysis buffer (e. g., 25 μ l x 10 tubes = 250 μ l).
 - c. Prepare the master mix by measuring the correct volume of Cell Lysis Buffer and Proteinase K into appropriate size test tube or flask and mix well.
4. Add 5 ml of Proteinase K/Cell Lysis Buffer to each labeled 50 ml tube.
5. Trim excess agarose from top of plugs with scalpel, razor blade or similar instrument. Open reusable plug mold and transfer plugs from mold with a 6-mm wide spatula to appropriately labeled tube.

If disposable plug molds are used, remove white tape from bottom of mold and push out plug(s) into appropriately labeled tube. Be sure plugs are under buffer and not on side of tube.

6. Remove tape from reusable mold. Place both sections of the plug mold, spatulas, and scalpel in 70% isopropanol (IPA), ethanol or other suitable disinfectant. Soak them for 15 minutes before washing them. Discard disposable plug molds or disinfect them in 10% bleach for 30-60 minutes if they will be washed and reused.

7. Place tubes in rack and incubate in a 54-55°C shaker water bath or incubator for 2 h with constant and vigorous agitation (150-175 rpm). If lysing in water bath, be sure water level is above level of lysis buffer in tubes.

8. Pre-heat enough sterile Ultrapure water (CLRW) to 54-55°C so that plugs can be washed two times with 10-15 ml water (200-250 ml for 10 tubes).

WASHING OF AGAROSE PLUGS AFTER CELL LYSIS

Note: Most laboratories will find that their plugs are sufficiently stable to perform the following washing steps at 54-55°C. However, if you notice that your plugs are nicked along the edges or breaking it will be necessary for your laboratory to lower the water bath or incubator to 50°C for the following washing steps.

1. Remove tubes from water bath or incubator, and carefully pour off lysis buffer into an appropriate discard container; plugs can be held in tubes with a screened cap or spatula.

2. Add at 10-15 ml sterile Ultrapure water (CLRW) that has been pre-heated to 54-55°C to each tube and shake the tubes in a 54-55°C water bath or incubator for 10-15 min.

3. Pour off water from the plugs and repeat wash step with pre-heated water (Step 2) one more time.

a. Pre-heat enough sterile TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) in a 54-55°C water bath so that plugs can be washed four times with 10-15 ml TE (300-350 ml for 10 tubes) after beginning last water wash.

4. Pour off water, add 10-15 ml pre-heated (54-55°C) sterile TE Buffer, and shake the tubes in 54-55°C water bath or incubator for 10-15 min.

5. Pour off TE and repeat wash step with pre-heated TE three more times.

6. Decant last wash and add 5-10 ml sterile TE. Continue with step 1 in "Restriction Digestion" section or store plugs in TE Buffer at 4°C until needed. Plugs can be transferred to smaller tubes for storage.

RESTRICTION DIGESTION OF DNA IN AGAROSE PLUGS

Note: A small slice of the plug or the entire plug (made in disposable plug molds) can be digested with the restriction enzyme. Restriction digestion of a small slice of the plug is recommended because less enzyme is required and other slices of the plug can be subjected to restriction analysis with other enzymes, such as *AscI*, etc. Restriction analysis with a secondary enzyme (*AscI*) is important in situations where the PFGE patterns obtained with the primary enzyme from two or more isolates are indistinguishable. The use of a second enzyme helps us determine relatedness of the isolates being tested by confirming that the PFGE patterns generated with these enzymes are also indistinguishable.

1. Label 1.5-ml microcentrifuge tubes with culture numbers; label 3 (10-well gel) or 4 (15-well gel) tubes for *Salmonella* ser. Braenderup H98123 standards.

a. Optional Pre-Restriction Incubation Step: Prepare a master mix by diluting the appropriate 10X restriction buffer	µl/Plug Slice	µl/10 Plug Slices
Sterile Clinical Laboratory Reagent Water	180 µl	1800 µl
Restriction Buffer	20 µl	200 µl
Total Volume	200 µl	2000 µl

Allegato B.

Scheda di notifica fonte umana del sistema di sorveglianza basato sulla Rete di Laboratorio corredata al ceppo batterico.



SCHEDA DI NOTIFICA FONTE UMANA

Sorveglianza degli enterobatteri patogeni: **SCHEDA PER STIPII ISOLATI DA FONTE UMANA**
 Se usate il fax, inviate questa scheda allo 06-49387292

A. Origine e caratteristiche del campione biologico

A1. Laboratorio di origine: _____ Prov. _____

A2. Prelievo effettuato nel comune di (località): _____ Prov. _____

A3. Codice dello stipite assegnato dal laboratorio di origine: _____ A4. Data prelievo del campione: _____

A5. Motivo di esecuzione dell'esame culturale: _____

Non noto Inf. acuta Inchiesta epidemiologica Controllo

C. Identificazione microbiologica e sensibilità agli antibiotici

C1. Identificazione:

Salmonella Shigella Campylobacter
 Yersinia E. coli Altro (spec.) _____

C2. Tipizzazione: _____

C3. Sensibilità agli antibiotici (segnare in ciascuna casella S, I o R):

NA	AM	CTX	CIP	C	GM
K	S	S3	Te	TMP	AMC
KF	SXT				

U. Informazioni sugli stipti di provenienza umana

U1. Tipo campione: Feci Sangue Altro specificare _____

U2. Cognome e nome del paziente: _____

U3. Sesso: Non noto Maschio Femmina

U4. Data di nascita: _____ U5. Età, anni: _____

U6. Comune di residenza del paziente (località): _____ Prov. _____

U7. Viaggi effettuati nei 30 gg prima dell'insorgenza dei sintomi:
 Non noto No SI (spec. dove)

U8. Paziente ospedalizzato: Non noto No SI

U9. Alimenti implicati:
 Non noto No SI (spec.) _____

U10. Se alimenti implicati, in base a:
 Sospetto Dati epidemiologici Isolamento microbiologico

D. Parte riservata al laboratorio di riferimento (regionale o sovrasregionale)

D1. Codice laboratorio: _____ D2. Codice assegnato allo stipite dal lab. di riferimento: _____

D3. Tipizzazione finale: _____ D4. Data tipizzazione: _____

D5. Sensibilità agli antibiotici (segnare in ciascuna casella S, I o R):

NA	AM	CTX	CIP	C	GM
K	S	S3	Te	TMP	AMC
KF	SXT				

D6. Cognome e nome del compilatore: _____ Telefono: _____

D7. Data di compilazione della scheda: _____

D8. Note: _____

53

Allegato C.

Scheda di notifica del sistema di sorveglianza MAINF.

Nuova pratica			
Dati paziente			
Cognome	LISPA	Nome	LISPA
Sesso	M	Data di nascita	
Comune di nascita		Provincia	
Codice fiscale			
Nazione di nascita	ITALIA	Nazionalità	
Dati generali			
Codice	240364	Patologia	EPATITE A
Data apertura pratica	05/07/2006		
Stato pratica	Aperta		
Esito malattia	<input type="text"/>		
Annotazioni	<input type="text"/>		
Inizio sintomi			
Data inizio sintomi	<input type="text"/>		
Provincia inizio sintomi	<input type="text"/>	Comune inizio sintomi	<input type="text"/>
Nazione contagio	ITALIA	Regione contagio	<input type="text"/>
Provincia contagio	<input type="text"/>	Comune contagio	<input type="text"/>
Struttura ricovero	<input type="text"/>		
Altra struttura ricovero	<input type="text"/>		
Segnalazione			
Data segnalazione	<input type="text"/>		
Medico segnalazione	<input type="text"/>	scegli	Tipo struttura segnalazione
			<input type="text"/>
Vaccino			
Vaccinato?	<input type="text"/>	Data vaccino	<input type="text"/>
Nome vaccino	<input type="text"/>	Numero dosi	<input type="text"/>
Focolaio			
Focolaio associato	<input type="text"/>		
Caso indice del focolaio?	<input type="checkbox"/>		
<input type="button" value="Salva"/> <input type="button" value="Annulla"/>			

RINGRAZIAMENTI

Non mi sembra vero che questa pagina esista, ma mi permette di ringraziare tutte le persone che mi sono state accanto in questi anni; anni ricchi di sorrisi, di lacrime, di rabbia, di gioia, di sogni: di vita!

Ringrazio la prof. Mirella Pontello per l'infinita pazienza dedicatami, per l'aiuto e lo stimolo affinché trovassi la mia strada nel mondo. Ringrazio il Dott. Antonio Parisi, Caterina Mammina e Irene Matuonto: colleghi di ricerca che nutrono una gran passione per la scienza.

Il CEPIS: Alessandra, Giuliana e Roberto che mi hanno accolto, aiutato e sostenuto in dipartimento; un grosso abbraccio e un grazie oltre che per il loro aiuto anche per l'amicizia regalatami.

Ringrazio i compagni di avventura, di ricerca e di pranzi nel parchetto: Veronica e Fabio, Alessandra R., Mirta, Francesca Z., Francesca M., Ettore, Elida, Monica, Irene.

Come dimenticare Rosy, Alice, Sara, Ricky, Apo, Beppe, Juan, Beppone, IlFrancy, Chiara e Dario, Maury e Chiara, miei più cari amici, che mi hanno supportata e sopportata sempre e comunque in ogni momento del mio cammino.

Infine un grazie immenso ad Angelo per la pazienza, il tempo, i consigli e l'amore che ogni giorno mi regala, senza cui nulla avrebbe senso.

Questa piccola vittoria però la dedico a mamma, papà e Lucy, per tutto quello che sappiamo e che non ha bisogno di parole.

Anna