

Università degli Studi di Milano
SCUOLA DI DOTTORATO
Scienze biomediche, cliniche e sperimentali
Corso di Dottorato in Sanità Pubblica



Epidemiologia della listeriosi invasiva in Regione Lombardia: identificazione dei genotipi emergenti

Dottorando:

Ettore AMATO

Matr. n. R09929

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa **Mirella PONTELLO**

Tesi svolta presso il Laboratorio enterobatteri patogeni del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli Studi di Milano

Anno Accademico 2014-2015

***“Considerate la vostra semenza:
fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza”***

(Divina Commedia, Inferno, XXVI Canto)

ABSTRACT

Listeriosis is a foodborne invasive disease that is of great interest to the field of public health due to the severity of clinical manifestations in patients at risk, like immunocompromised individuals and pregnant women. The incidence reported by the passive surveillance system in industrialized countries is less than 1 per 100,000 inhabitants, but under-diagnosis or under-reporting factors can affect these data and they are not easily quantifiable. The Italian listeriosis incidence is much lower (0.19-0.22 per 100,000 inhabitants) than the European incidence (0.33–0.44 per 100,000 inhabitants). In Lombardy, the national mandatory notification system has been implemented since 2006 with the regional electronic database (MAINF) and a Laboratory-based Surveillance System (LabSS).

Considering that it is difficult to conduct epidemiological investigations of listeriosis and estimates may be biased downward, the present analysis aims to i) better understand the epidemiology of listeriosis in Lombardy, ii) characterise the *Listeria monocytogenes* isolates by advanced molecular analysis in order to detect emerging strains and possible epidemic clusters.

All cases of listeriosis in persons resident in the Lombardy Region and detected between 2006 and 2014 in at least one of two informative sources (MAINF and LabSS) were included. All human *L. monocytogenes* isolates collected by LabSS from 2006 to 2014 were studied.

All isolates were serotyped by using antisera against O and H antigens. PFGE was performed according to the PulseNet protocol (Graves L.M. et al., 2001) with the *Ascl* and *Apal* enzymes. After *Ascl* and *Apal* digestion, similarity clustering analysis was performed with BioNumerics software (version 5.1; Applied Maths, Saint-Martins-Latem, Belgium). Sequence types (STs) were identified by PCR amplification of seven housekeeping genes (Salcedo C. et al., 2003; Ragon et al., 2008). Alleles and STs were assigned by submitting the DNA sequences to the *Listeria* MLST database at the Pasteur Institute, France (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Virulence types (VTs) were identified by PCR amplification of six virulence genes (Chen Y et al., 2007; Knabel SJ et al., 2012). Virulence gene sequences were compared to available data

obtained from isolates representing major human listeriosis outbreaks worldwide, and other unrelated isolates (<https://sites.google.com/site/mvlstdatabase/home>).

Based on MAINF notifications and LabSS records, 580 cases of invasive listeriosis were observed in the nine year period under study (2006-2014). The mean annual incidence of listeriosis based on MAINF notifications was 0.56 per 100,000 inhabitants but it rose to 0.67 per 100,000 inhabitants once the cases detected only by the LabSS system and “lost” by the MAINF system were taken into account. The average incidence is high with a peak in 2011 (0.96 per 100,000 inhabitants), and in the Sondrio, Bergamo and Lecco provinces (1.11, 1.02, 1.00 per 100,000 inhabitants, respectively).

The “lost” cases, computed as the difference between the estimated cases and observed cases on estimated cases, was found to be 21% with significant differences by year and province. We found that the under-reporting factor affects all invasive listeriosis cases, while the under-diagnosis factor is more associated with pregnancy-related cases (6.7% of total cases). We hypothesize that the higher listeriosis incidence reported in Lombardy relative to the rest of the country as well as the upward trend in listeriosis incidence are attributable not only to the increased surveillance sensitivity, but also reflect a real increased incidence associated with the presence of people at risk for underlying disease conditions and/or social disadvantage.

Regarding the microbiological and molecular characterizations, the predominant serotypes were 1/2a (60.9%), followed by 4b (26.3%) and 1/2b (10.4%). Multi-Locus Sequence Typing (MLST) revealed 52 Sequence Types (STs) were identified, of which the 6 most common STs were ST38 (14.9%), ST1 (12.8%), ST8 (9.3%), ST155 (7.6%), ST2 (5.9%) and ST3 (5.9%), accounting for 56.4% of the isolates. The distribution of ST38 and PFGE analysis led us to hypothesize the likely occurrence of an outbreak which had gone undetected by local health authorities during the period 2006-2014. In particular, identification of ST38 isolates began in 2006 (n=2), peaked in the period 2009-2011 (n=36) and continued in next years with sporadic cases (2013, n=1; 2014, n=2). The Multi-Virulence-Locus Sequence Typing (MVLST)

revealed that the ST38 isolates split into two Virulence Type (VT) with different spatio-temporal distributions: VT80 and VT104. For these cases, an epidemiological investigation had been implemented and for only one case (ST38/VT104), the implicated food (smear cheese) was recognized and confirmed by MVLST. This result represents an outstanding goal, as it is the first Outbreak Clone detected in Italy.

Moreover, this study identified the prominent STs circulating in our regional area and contributed to our understanding of the genetic heterogeneity of *L. monocytogenes*. Monitoring STs can provide essential information for preventing listeriosis and supporting investigations on source identification and transmission routes, which, due to the peculiar epidemiological and clinical characteristics of this disease, are often very challenging.

We propose that the integrated surveillance system in the Lombardy region is a highly acceptable model for the rest of the country, where the eating habits and the risk of exposure are more diversified.

INDICE

1	INTRODUZIONE	8
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.1.1	Tassonomia	8
1.1.2	Caratteristiche microbiologiche	8
1.1.3	Meccanismi di virulenza	9
1.1.4	Meccanismi di sopravvivenza in condizioni ambientali avverse	11
1.1.5	Ecologia	13
1.2	Listeriosi	15
1.2.1	Dose infettante	15
1.2.2	Virulenza del ceppo	16
1.2.3	Suscettibilità dell'ospite e fattori di rischio nell'uomo	17
1.2.4	Patogenesi	20
1.2.5	Clinica	22
1.2.5.1	Portatori asintomatici	22
1.2.5.2	Listeriosi non invasiva	23
1.2.5.3	Listeriosi invasiva	23
1.2.5.4	Forme associate alla gravidanza	23
1.2.6	Accertamento diagnostico	25
1.2.7	Terapia	26
1.3	Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia della listeriosi	26
1.4	Tipizzazione intraspecifica ed epidemiologia molecolare	34
1.4.1	Tipizzazione fenotipica	35
1.4.2	Tipizzazione genetica	36
1.4.3	Modelli applicati all'epidemiologia molecolare	38
2	SCOPO	43
3	MATERIALI E METODI	44
3.1	Studio epidemiologico	44

3.1.1	Fonti informative e raccolta dati	44
3.1.2	Sistema di notifiche in Regione Lombardia	44
3.1.3	Sorveglianza di laboratorio	44
3.1.4	Elaborazione dati	45
3.2	Caratterizzazione microbiologica di <i>L. monocytogenes</i>	46
3.2.1	Caratterizzazione fenotipica	46
3.2.2	Caratterizzazione genotipica	47
3.3	Analisi delle correlazioni spazio temporali dei casi	52
3.3.1	Inchieste epidemiologiche	52
3.3.2	Analsi statistica	52
3.4	Modelli applicati in epidemiologia molecolare	54
4	RISULTATI	55
4.1	Listeriosi in Lombardia: epidemiologia descrittiva	55
4.2	Caratteristiche microbiologiche ed epidemiologia molecolare	58
4.2.1	Caratteristiche fenotipiche: tipizzazione sierologica	58
4.2.2	Caratteristiche genotipiche: Multi-Locus Sequence Typing	59
4.3	Distribuzione spazio-temporale dei principali genotipi	60
4.4	Compendio: caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei principali genotipi	67
4.5	Sequence Type 38: ceppo emergente in Regione Lombardia	68
4.6	Modelli applicati in epidemiologia molecolare	74
5	DISCUSSIONE	76
5.1	Listeriosi in Lombardia: epidemiologia descrittiva	76
5.2	Caratteristiche microbiologiche ed epidemiologia molecolare	79
5.3	Modelli applicati in epidemiologia molecolare	81
6	CONCLUSIONI	83
	BIBLIOGRAFIA	85
	SITOGRAFIA	101
	RINGRAZIAMENTI	105

1. INTRODUZIONE

1.1. *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Tassonomia

Listeria appartiene all'ordine dei *Bacillales* della famiglia delle "*Listeriaceae*" [Wellinghausen N., 2011]. Il genere *Listeria* comprende: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* e *L. grayi* [Orsi R. et al, 2011]. A queste specie se ne aggiungono altre due descritte nel 2012: *L. fleischmannii* e *L. weihnstephanensis* [Lang Halter E. et al, 2013; Bertsch D. et al, 2013].

1.1.2 Caratteristiche microbiologiche

L. monocytogenes (*Lm*) è un batterio gram positivo, anaerobio facoltativo, asporigeno, a forma bastoncillare e di dimensioni ridotte (0,5-2 μm per 0,4-0,5 μm). Spesso più bastoncini si organizzano in corte catene che raggiungono una lunghezza massima di 6-20 μm . Il microrganismo è dotato di una motilità di tipo "*tumbling*" grazie alla presenza di flagelli peritrichi la cui espressione e il cui assemblaggio sono strettamente dipendenti dalla temperatura. In un range di 20-28°C la flagellina viene sia sintetizzata che assemblata, mentre oltre i 37°C la produzione della flagellina è marcatamente ridotta [Farber J. et al, 1991; Wellinghausen N., 2011]. Generalmente gli isolati sono catalasi positivi, anche se alcuni ceppi isolati dall'uomo sono risultati catalasi negativi. Viceversa il test per l'ossidasi è negativo. *Lm* è un microrganismo fermentante che produce acidi a partire da diversi zuccheri. In condizioni di anaerobiosi la crescita del batterio è supportata da esosi e pentosi, tra cui il glucosio, mentre in condizioni di aerobiosi i substrati energetici sono il lattosio e il maltosio. *Lm* è in grado di crescere in un intervallo di temperatura particolarmente ampio, da 2 a 45°C. Nonostante l'optimum sia quello tipico dei mesofili (30-37°C), questa specie è considerata psicrotrofa in quanto sopravvive e replica anche a basse temperature. La parete cellulare è composta per circa il 35% da peptidoglicano, mentre la restante parte è costituita da acidi lipoteicoici [Farber J. et al, 1991; Wellinghausen, 2011].

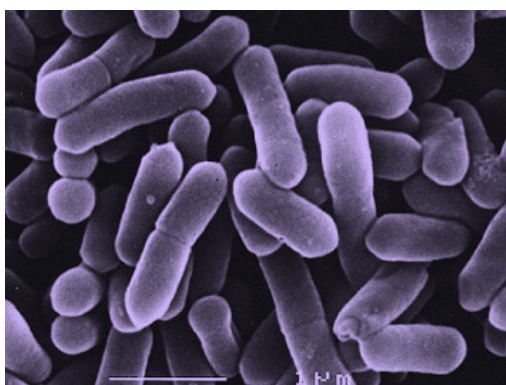


Figura 1: *Listeria monocytogenes* [Bunic S., Avery S. M., 2004]

1.1.3 Meccanismi di virulenza

Lm è un patogeno intracellulare facoltativo, per questo è in grado di sopravvivere e replicarsi sia come saprofito ambientale che come patogeno intracellulare (Figura 2) [Gray M. C. et al, 2006; Freitag N. E. et al, 2009].

Come patogeno *Lm* induce la propria internalizzazione in diversi tipi di cellule: macrofagi, cellule epiteliali, fibroblasti, epatociti, cellule endoteliali, cellule nervose. Il processo che media l'invasione cellulare sfrutta un meccanismo a cerniera che permette al batterio di approfondirsi gradualmente nella membrana cellulare fino alla sua completa fagocitosi [Wellinghausen N., 2011]. Questo fenomeno richiede una prima interazione con la cellula eucariota che avviene grazie a proteine, l'internalina A (InIA) e l'internalina B (InIB), presenti sulla parete cellulare batterica. L'interazione di queste proteine con il recettore cellulare, rispettivamente E-caderina e *Hepatocyte Growth Factor Receptor* (met/HGF-R), innesca una cascata del segnale intracellulare che induce la riorganizzazione del citoscheletro al fine di promuovere la fagocitosi da parte della cellula ospite [Seveau S. et al, 2007]. *Lm* si viene quindi a trovare all'interno di vacuoli intracellulari, dove però non è in grado di replicarsi. Dal momento che la sua nicchia replicativa è l'ambiente citoplasmatico, la fuoriuscita da questi fagosomi è necessaria per il completamento del proprio ciclo intracellulare. A questo scopo il batterio secerne listeriolisina O (LLO), una esotossina citolitica che lisa il fagosoma permettendo al patogeno di passare al citosol. Una volta che è uscita dal vacuolo *Lm* può cominciare a moltiplicarsi, acquisendo dall'ospite tutti i nutrienti necessari [Schnupf P. et al, 2007].

Segue una fase di migrazione del microrganismo verso le cellule adiacenti che però non è mediata dai flagelli batterici come in altri *foodborne pathogen*: *Lm* ottiene infatti la forza propulsiva al proprio movimento dal processo di polimerizzazione polarizzata dei

filamenti di actina della cellula ospite. Tale meccanismo è indotto da ActA (*Actin Assembly-inducing protein*), una proteina distribuita in maniera asimmetrica sulla parete cellulare del batterio che promuove la deposizione di monomeri di actina all'interfaccia tra la superficie batterica e i filamenti di actina della cellula ospite [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Cossart P. et al, 2001]. Sospinta da queste strutture, la progenie batterica viene internalizzata dalle cellule adiacenti per fagocitosi. In questo modo *Lm* si viene a trovare nuovamente all'interno di un vacuolo che, a differenza di quello primario, è costituito da una doppia strato membranoso: internamente troviamo la membrana citoplasmatica della cellula di provenienza ed esternamente la membrana della cellula appena infettata. Per riuscire a lisare questa doppia membrana, il microrganismo utilizza oltre alla LLO, due fosfolipasi: PI-PLC (fosfolipasi C fosfatidilinositolo specifica) e PC-PLC (fosfolipasi C fosfatidilcolina specifica). Una volta che la progenie entra in contatto col citoplasma di un'altra cellula, ricomincia un nuovo ciclo infettivo intracellulare [Schnupf P. et al, 2007].

È importante sottolineare che la capacità di *Lm* di replicare all'interno della cellula e di diffondere da una cellula all'altra, senza entrare in contatto con l'ambiente extracellulare, rappresenta un grande vantaggio per il microrganismo, perché limita la sua esposizione al sistema immunitario umorale dell'ospite, che così può essere aggirato [Freitag N. E. et al, 2009].

Tutti i prodotti coinvolti nei processi di invasione, lisi dei fagosomi, crescita, mobilità intracellulare e diffusione alle cellule limitrofe, sono fattori di virulenza. Poiché si sta parlando di un patogeno intracellulare facoltativo, ben adattato anche alla vita nell'ambiente esterno, i geni che codificano per questi fattori vengono espressi solo all'occorrenza [Freitag N. E. et al, 2009]. Ciò è possibile grazie a PrfA, un fattore trascrizionale in grado di indurre l'espressione dei geni di virulenza solo durante l'infezione di una cellula ospite. La presenza di PrfA nella cellula batterica non è costante: infatti, sebbene il corrispondente mRNA sia costitutivamente presente, la sua traduzione si attiva solo a una temperatura di 37°C, ovvero quando il batterio si trova all'interno di un ospite. Fintanto che il microrganismo si trova nell'ambiente esterno, questo mRNA non viene tradotto, perché si trova ripiegato in una struttura secondaria inaccessibile al ribosoma, che viene destabilizzata solo dalla temperatura corporea. Oltre a una regolazione a livello traduzionale, esiste anche una regolazione dell'attività di PrfA. La presenza di zuccheri comunemente distribuiti nell'ambiente naturale (glucosio, fruttosio, mannosio, cellobiosio) reprime l'attività del fattore di trascrizione, mentre in

presenza di zuccheri tipici dell'ambiente intracellulare (gli esosio-fosfati) la sua attività è incentivata. Dunque PrfA, rispondendo a stimoli extracellulari promuove un rapido adattamento di *Lm* alla sua localizzazione contingente, determinando così la conversione di *Lm* da saprofita ambientale a patogeno [De Las Heras A. et al, 2011].

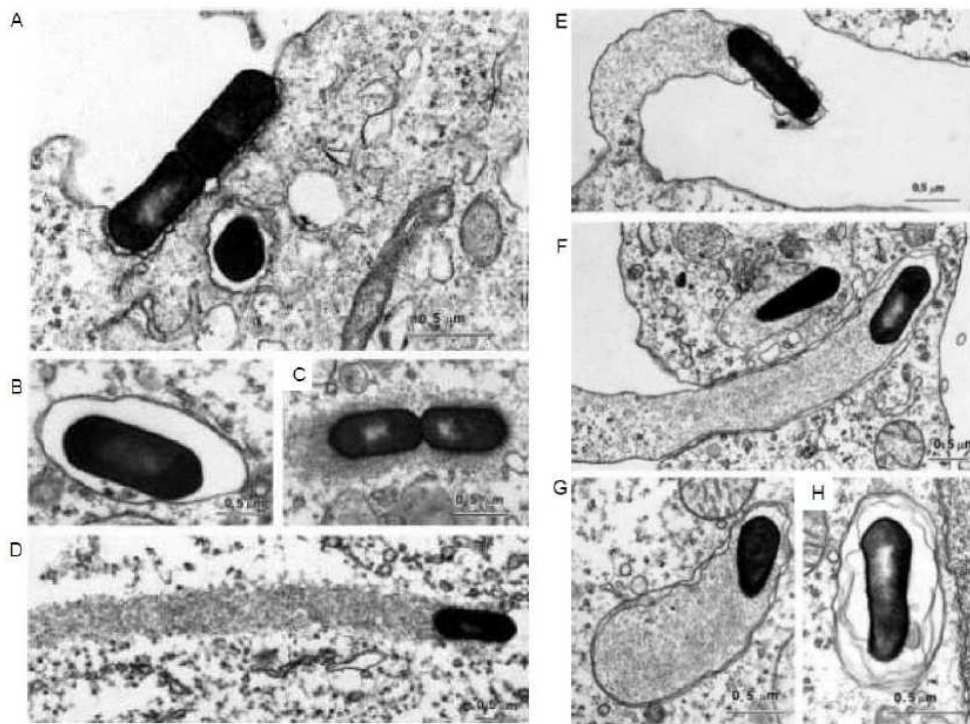


Figura 2: Meccanismo di infezione cellulare di *L. monocytogenes*: (A, B) ingresso e formazione del fagosoma, (C, D) divisione e movimento intracellulare, (E, F) passaggio alla cellula adiacente, (G, H) formazione e lisi del vacuolo secondario [Cossart P. et al, 2001]

1.1.4 Meccanismi di sopravvivenza in condizioni ambientali avverse

L. monocytogenes è in grado di sopravvivere e crescere in condizioni ambientali molto varie. Sebbene non produca spore, questo batterio è dotato di una forte resistenza ambientale e può sopportare stress termici, osmotici e chimici [Gray M. C. et al, 2006].

Il range di temperatura a cui *Lm* è in grado di crescere è molto ampio. Questo microrganismo, grazie a meccanismi adattativi intrinseci, riesce a tollerare ambienti freddi (2-4°C) senza compromettere il proprio tasso metabolico. A basse temperature infatti si assiste alla modificazione della composizione lipidica della membrana cellulare, volta ad aumentarne la fluidità, e all'induzione della produzione di *Cold shock proteins*

(Csps) che garantiscono al batterio il mantenimento dell'integrità delle proprie strutture e delle proprie attività metaboliche [Gandhi M. et al, 2007; Chan Y. C. et al, 2009]. Alcune Csps, oltre che essere essenziali per la resistenza alle basse temperature, sono importanti anche per la tolleranza all'iperosmolarità contrastando la compromissione delle funzioni e delle strutture cellulari [Cetin M. S. et al, 2004; Chan Y. C. et al, 2009].

Lm è un microrganismo che predilige ambienti a pH neutro, tuttavia è frequentemente esposto a pH acidi, sia negli habitat naturali (piogge acide, insilati, cibi fermentati e mangimi) che nell'organismo ospite (secrezioni acide, fagosomi intracellulari). In risposta all'abbassamento del pH si assiste a un incremento della sintesi di proteine che proteggono dalla denaturazione proteica e promuovono l'estrusione di protoni dalla cellula. È importante sottolineare che l'esposizione a pH lievemente acido induce in *Lm* un fenomeno di adattamento che le permette in un secondo momento di resistere a condizioni di acidosi più spinte [Chaturongakul S. et al, 2008; Gandhi M. et al, 2007].

Le proprietà descritte finora concorrono a rendere questo microrganismo di difficile controllo da parte dell'industria alimentare, in cui le principali tecniche utilizzate per aumentare la shelf-life dei prodotti e contrastare la crescita microbica sono la refrigerazione, l'acidificazione e la salatura [Gandhi M. et al, 2007].

Lm ha un'altra caratteristica di resistenza a condizioni ambientali avverse, la cui rilevanza per l'industria alimentare è minore rispetto al ruolo che ricopre nei processi di invasione dell'ospite. Si tratta della tolleranza ai sali biliari secreti nell'intestino tenue dei mammiferi i quali, grazie alle loro proprietà detergenti, non solo emulsionano gli acidi grassi alimentari permettendone la digestione, ma espletano anche attività antibatterica, destabilizzando i lipidi presenti a livello della parete cellulare. Infatti, sempre grazie all'induzione della sintesi di specifiche proteine, *Lm* è in grado di degradare i sali biliari, resistendo quindi alla loro attività battericida [Sleator R. D. et al, 2009].

Ciò che accumuna i meccanismi di sopravvivenza agli stress ambientali sopra citati è la modificazione dell'espressione genica del microrganismo con la produzione di sistemi funzionali alla sua resistenza in condizioni ambientali contingenti. Nei batteri in generale esistono vari fattori σ ognuno dei quali si attiva in risposta a precisi stimoli esogeni a cui la cellula procariota è sottoposta. Una volta che un fattore σ è attivo, va ad associarsi al core dell'RNA polimerasi promuovendo il suo legame a precise sequenze promotore e inducendo il processo trascrizionale. Nel caso di condizioni di stress, sia esso termico, chimico o osmotico, il fattore σ che entra in gioco è σ^B che induce la cosiddetta "general stress response" [Chaturongakul S. et al, 2008].

Caratteristica cruciale di *Lm* è la resistenza crociata (“*cross-protection*”) a più fattori di stress. L’esposizione a una tipologia di stress induce nel batterio un fenomeno di adattamento che gli permette di aumentare la soglia di tollerabilità nei confronti di quello e di altri tipi stress. Per esempio ceppi di *Lm* adattati a ambienti acidi mostrano un’augmentata tolleranza al sale rispetto a ceppi che non sono stati precedentemente esposti a bassi pH. L’esposizione sequenziale a stimoli stressori differenti è frequente nel *food processing* e rappresenta un problema chiave per il controllo della contaminazione microbiologica del prodotto, in quanto determina lo sviluppo di forme di resistenza ai trattamenti di sanificazione a cui il batterio non è ancora stato esposto [Gandhi M. et al, 2007].

Per concludere è importante ricordare che *Lm* è in grado di colonizzare superfici ambientali all’interno di biofilm, ovvero comunità di cellule immerse in una matrice extracellulare polimerica prodotta dai batteri stessi. All’interno di questa struttura le cellule risultano irreversibilmente legate a un substrato e le une con le altre. I biofilm permettono di aumentare la sopravvivenza, la propagazione e la trasmissione di *Lm*, garantendole il successo riproduttivo in una determinata nicchia ecologica. Inoltre è stato dimostrato che all’interno dei biofilm il patogeno acquisisce una maggiore resistenza ad agenti antimicrobici, disinfettanti e agli stress ambientali.

La propensione di *Lm* a formare tali strutture [Gandhi M. et al, 2007; Valderrama W. B. et al, 2013]:

- è dipendente dalle condizioni ambientali (temperatura, pH, NaCl, nutrienti);
- aumenta a seguito all’esposizione a condizioni ambientali avverse;
- è ceppo specifica;

Nelle industrie alimentari la presenza di biofilm mono- o pluri-colturali di *Lm* è preoccupante poiché rende il batterio di difficile eliminazione. Per questa ragione e per tutelare la salute del consumatore è di grande importanza migliorare il controllo e la prevenzione della formazione di queste strutture [Gandhi M. et al, 2007].

1.1.5 Ecologia

Considerando le proprietà di resistenza di *Lm* in condizioni ambientali avverse e la sua attitudine a vivere come saprofita ambientale non sorprende che questo microrganismo sia ampiamente diffuso in contesti naturali come il suolo, l’acqua e i vegetali in decomposizione [Fenlon D. R., 1999].

Il suolo è un ambiente fresco e umido, ideale per la sopravvivenza di *Lm*; la sua contaminazione avviene a seguito del contatto con materiali vegetali contaminati, feci animali e fanghi di depurazione.

Lm inoltre è frequentemente presente anche sui vegetali la cui contaminazione è una conseguenza dello stretto contatto col terreno, con le acque e con feci animali [Ivanek R. et al, 2006]. Inoltre se i vegetali vengono utilizzati per la produzione di insilati, durante il processo di fermentazione si può creare un habitat ideale per la crescita del patogeno. Normalmente nell'insilato si realizzano condizioni di anaerobiosi che favoriscono prevalentemente la moltiplicazione di batteri lattici. Questi grazie alla loro attività fermentante producono acido lattico determinando un abbassamento del pH sotto le 4,5 unità. In tali condizioni di acidosi la crescita di *Lm* è inibita, per cui se anche fosse stata presente nella materia prima, non raggiungerebbe una quantità elevata e pericolosa [Fenlon D. R., 1999]. Tuttavia se si creano nicchie di aerobiosi dell'insilato, per esempio se sono presenti fori nell'imballaggio, il processo fermentativo rallenta e i batteri lattici possono essere scalzati da altri microrganismi che sono strettamente aerobi e non fermentanti, come lieviti e muffe. Di conseguenza il pH sale e *Lm* può moltiplicarsi [Ivanek R. et al, 2006]. Negli insilati il batterio può vivere a lungo, anche per anni. Il lato positivo però è che normalmente, laddove c'è contaminazione si creano aree visibilmente ammuffite che si presume vengano scartate prima di essere somministrate agli animali come foraggio [Fenlon D. R., 1999].

A causa della natura ubiquitaria di *Lm*, del contatto dell'acqua col suolo e i vegetali e dell'utilizzo delle acque superficiali come scarico per i reflui, è inevitabile trovare una certa carica di questo microrganismo anche nelle acque, sia dolci che salate [Fenlon D. R., 1999]. Le acque reflue, costituite da rifiuti urbani e agricoli, sono un mezzo ottimale per l'insediamento, la sopravvivenza e la moltiplicazione del batterio. Il livello di contaminazione dei reflui dipende dall'entità della contaminazione dei rifiuti che li alimentano, dalla quantità di questi rifiuti e dai trattamenti a cui vanno incontro prima di essere disperse nell'ambiente, anche se bisogna ricordare che tali trattamenti normalmente non inattivano tutte le *Listerie* [Ivanek R. et al, 2006].

La capacità di *L. m.* di diffondere con facilità nell'ambiente associata alla sua sopravvivenza, protratta nel tempo, in diversi habitat hanno portato a considerare l'ambiente naturale come il serbatoio del batterio [Fenlon D. R., 1999]. Il carattere ubiquitario di *Lm* fa in modo che uomo e animali siano frequentemente esposti a questo microrganismo [Weis J. et al, 1975], che viene veicolato loro da alimenti e insilati,

mangimi e vegetali contaminati. Una volta infettati sia l'uomo che gli animali possono disperdere il patogeno attraverso le feci, chiudendo il ciclo di diffusione [Farber J. M., Peterkin P. I., 1999] (Figura 3).

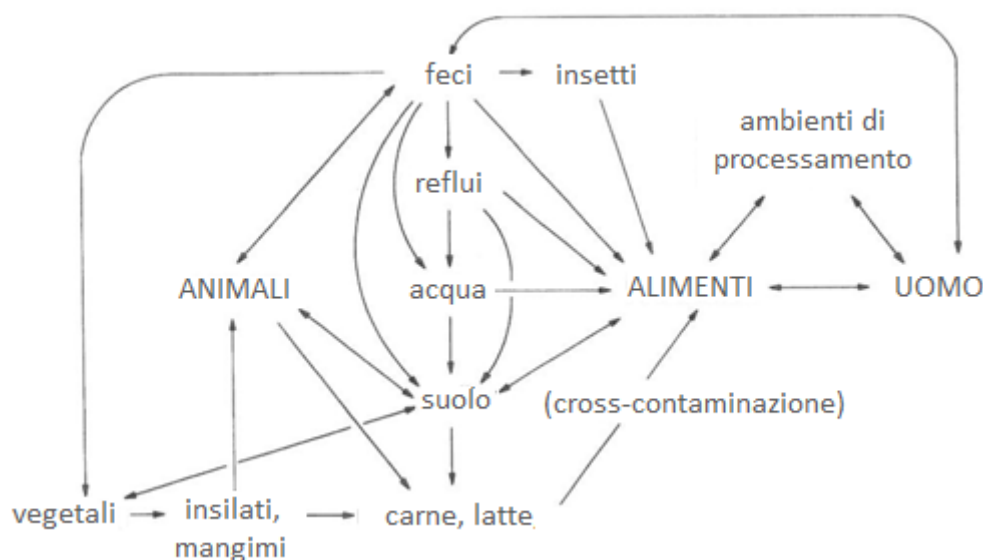


Figura 3: Diffusione ambientale e trasferimento di *L. monocytogenes* agli animali e all'uomo [R. E. Brackett, 1999]

1.2 Listeriosi

Sebbene l'esposizione della popolazione all'infezione da parte di *Lm* sia molto ricorrente a causa della elevata prevalenza del patogeno negli alimenti [Ramaswamy V. et al, 2012], perché si manifesti la patologia è necessario il concorso di più fattori: la carica infettante, la virulenza del ceppo di *Lm* e la suscettibilità dell'ospite.

1.2.1 Dose infettante

Il potenziale patogeno di *Lm* è relativamente basso se confrontato con quello di altri *food-borne pathogens*, come suggerito dalla determinazione sperimentale della LD₅₀ (*Lethal Dose 50*) nei topi. Tali studi hanno definito una LD₅₀ di 10⁹ ufc negli animali infettati per via alimentare, e di 10⁵ - 10⁶ ufc in quelli infettati per via parenterale. La minima dose infettante per l'uomo, necessaria a determinare l'infezione e la sua manifestazione clinica, non è stata determinata in maniera univoca [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001]. Indicativamente si ritiene che possa variare dalle 10² ufc alle 10⁹ ufc [Jemmi T., Stephan R., 2006]. Negli alimenti implicati in eventi epidemici, la carica

rilevata si aggira generalmente attorno a 10^6 ufc/g, quindi risulta elevata. Tuttavia poiché nel caso delle forme invasive la sintomatologia insorge generalmente dopo un lungo periodo di incubazione il batterio può moltiplicarsi nell'alimento prima che questo venga sottoposto a campionamento. Questo significa che la carica rilevata sarà più alta di quella presente nell'alimento al momento del consumo e quindi non si può escludere che la minima dose infettante sia stata più bassa, in particolar modo per i soggetti a rischio. Difatti, cariche di 10^2 e 10^3 cellule per g di alimento infetto sono stati associati a casi di listeriosi umana [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001]. È importante considerare che la carica infettante (ufc/g di alimento) non è influenzata solo dallo stato di salute dell'ospite, ma anche dalla virulenza e patogenicità del ceppo e della quantità di alimento che si consuma in relazione al suo livello contaminazione [Farber J. M. et al, 1996] .

In Europa il Regolamento (CE) No 2073/2005 ha posto a 100 ufc/g di alimento il livello di tolleranza della contaminazione delle produzioni alimentari da parte di *Lm*. Questo limite si suppone possa garantire un'adeguata tutela della salute dell'intera popolazione [The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011]. Negli Stati Uniti invece, considerate le caratteristiche del patogeno e della patologia e la variabilità della minima carica infettante, è stata adottata la politica della "tolleranza zero", ovvero assenza del patogeno in un campione da 25 g di alimento destinato al consumo umano [Adzitey F., Huda N., 2010].

1.2.2 Virulenza del ceppo

Più studi suggeriscono che tra i vari ceppi di *Lm* esiste una differente virulenza, quindi una diversa capacità di provocare infezione e di indurre l'insorgenza della patologia. Dei 13 sierotipi di *Lm*, tre risultano associati a circa il 95% dei casi di listeriosi, e sono il 4b, 1/2a e 1/2b [Swaminathan B, Gerner-Smidt P., 2007; Gerner-Smidt P. et al, 2005; Ramaswamy V. et al, 2012]. Mentre i ceppi 4b sono responsabili di più del 50% dei casi totali di listeriosi nel mondo, quelli appartenenti al gruppo antigenico 1/2 (1/2a, 1/2b e 1/2c) predominano tra gli isolati alimentari. Questo porta a pensare che il sierotipo 4b, rispetto all' 1/2, sia meglio adattato ai tessuti dei mammiferi e viene considerato più virulento, dal momento che è implicato nei maggiori focolai epidemici di listeriosi invasiva ed è spesso isolato da pazienti affetti da meningoencefalite [Ramaswamy V. et al, 2012; Vazquez-Boland J. A. et al, 2001].

Tuttavia è importante portare all'attenzione il fatto che negli ultimi anni sembra esserci stato un cambiamento di tendenza. Si è verificato, infatti, un importante aumento del

numero di casi di listeriosi in Europa dovuti al sierotipo 1/2a, a prevalente carattere setticemico. Si è portati quindi a credere che il sierotipo 1/2a stia gradualmente sostituendo il 4b come sierotipo prevalentemente implicato nei casi di listeriosi umana [Mammina C. et al, 2013; Pontello M. et al, 2012].

1.2.3 Suscettibilità dell'ospite e fattori di rischio nell'uomo

Sebbene l'esposizione di un soggetto sano ad alte cariche infettanti non escluda l'insorgenza della malattia, il fattore di rischio più rilevante per l'ospite è la compromissione della funzionalità del sistema immunitario [Buchholz U., Mascola L., 2001]. La principale difesa nei confronti della patologia è rappresentata, infatti, dall'immunità cellulo mediata; se la sua efficienza viene alterata, per ragioni fisiologiche o patologiche, il soggetto risulterà predisposto a contrarre l'infezione e a sviluppare la malattia. La propensione del microrganismo a provocare listeriosi in soggetti immunocompromessi, spiega perché *Lm* viene considerato un patogeno opportunista [Swaminathan B, Gerner-Smidt P., 2007; Vazquez-Boland J. A. et al, 2001].

Possiamo individuare le seguenti categorie di soggetti a rischio:

- neonati, il cui sistema immunitario non è ancora completamente sviluppato né del tutto efficiente [Lund B. M., O'Brien S. J., 2011];
- anziani, nei quali l'attività del sistema immunitario è fisiologicamente ridotta per un fenomeno di immunosenescenza [Muñoz P. et al, 2012];
- donne in gravidanza, le quali subiscono dei cambiamenti nell'immunità cellulo mediata, al fine di tollerare gli antigeni fetali e scongiurare il rigetto del prodotto del concepimento [Jamieson D. J. et al, 2006; Lamont R. F. et al, 2011];
- malati di cancro e soprattutto di emopatie (linfoma, leucemia, mieloma), per i quali si sommano gli effetti immunodepressivi della patologia con quelli conseguenti le terapie (chemio- e radio-terapia). Circa un terzo dei casi di listeriosi non associati alla gravidanza interessano soggetti affetti da neoplasie [Lund B. M., O'Brien S. J., 2011];
- soggetti sottoposti a trapianti d'organi, ivi compresi i trapianti di midollo, che sono quindi soggetti a terapie immunosoppressive per aumentare le chance di successo dell'intervento [Rocourt J., 1996];
- pazienti affetti da patologie autoimmuni (artrite reumatoide, lupus), spesso trattate con terapie immunosoppressive (corticosteroidi, farmaci citotossici) e farmaci

antiinfiammatori, che predispongono il soggetto all'infezione [Lund B. M., O'Brien S. J., 2011];

- soggetti con infezione da HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), che riduce il numero di linfociti T, anche se ad oggi le infezioni di *Lm* in soggetti affetti da AIDS sono abbastanza rare, molto probabilmente per la dieta priva di cibi ad alto rischio che i pazienti seguono e per i trattamenti antimicrobici a cui sono sottoposti regolarmente [Swaminathan B, Gerner-Smidt P., 2007];
- pazienti affetti da epatopatie e nefropatie croniche che sono inevitabilmente associate a uno stato di compromissione del sistema immunitario e determinano un aumento del ferro nel sangue che favorisce la proliferazione del patogeno [Lund B. M., O'Brien S. J., 2011; Rocourt J., 1996];
- soggetti diabetici, nei quali il cattivo controllo della glicemia risulta associato a uno scorretto funzionamento dei fagociti [Lund B. M., O'Brien S. J., 2011].

L'aumento dei soggetti con la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) negli anni passati e la diffusione dell'utilizzo di farmaci immunosoppressivi per il trattamento dei tumori e per la gestione dei trapianti d'organo, hanno ampliato notevolmente la popolazione a rischio di listeriosi. Questo incremento dei soggetti predisposti all'infezione, associato all'alto tasso di letalità della malattia (20-30%) e alla frequente presenza del microrganismo negli alimenti, ha aumentato l'attenzione delle autorità competenti nei confronti di *Lm* nella suo ruolo di patogeno umano [Slutesker L., Schuchat A., 1999].

Uno studio francese del 2012 (Tabella 1) ha cercato di definire il grado di rischio di contrarre l'infezione a cui sono sottoposti i vari gruppi di soggetti predisposti, analizzando i casi di listeriosi rilevati nell'intera nazione dal 2001 al 2008. Questo studio ha comparato i vari gruppi a rischio, con la popolazione sana di età <65 anni, e ha dimostrato che i soggetti affetti da leucemia linfatica cronica sono i più vulnerabili alla malattia, con un'incidenza > 1000 volte superiore rispetto alla popolazione priva di fattori di rischio. I soggetti affetti da carcinoma epatico, forme mieloproliferative, mieloma multiplo, leucemia acuta, arterite temporale, dialisi, cancro all'esofago, allo stomaco, al pancreas, al polmone e al cervello, cirrosi, trapianti d'organo e gravidanza sono esposti a un rischio di listeriosi di 100-1000 volte superiore a quello della popolazione. Per tutti gli altri gruppi, il rischio è al massimo di 100 volte superiore rispetto al gruppo di controllo. Oltre a ciò, si è potuto verificare come lo stato di salute influenzi anche la prognosi dell'infezione da *Lm*. Il tasso di letalità è infatti del 5% in assenza di fattori di rischio,

mentre può raggiungere anche valori del 40% in soggetti a rischio. Definire il rischio relativo e il tasso di letalità associato alla popolazione a rischio è essenziale per stabilire e dare priorità a strategie preventive indirizzate in maniera specifica a tali gruppi [Goulet V. et al, 2012].

Tabella 1: Incidenza della listeriosi, rischio relativo e tasso di letalità nei gruppi di popolazione a rischio [Goulet V. et al, 2012].

Condizione di base	Incidenza ^a	Risk ratio ^b	Tasso di letalità ^c
Cancro	3,75	78	28
Tumori non ematologici			
Tumore al fegato	36,11	748	31
Tumore all'esofago	16,25	336	23
Tumore al polmone	13,29	275	42
Tumore al pancreas	12,50	259	43
Tumore allo stomaco	6,85	142	29
Tumore al cervello	6,03	125	36
Tumore colo rettale	3,44	71	24
Tumore al labbro, al naso e al cavo orale	1,77	37	39
Tumore al seno	1,34	28	23
Tumore alla prostata	0,91	19	32
Tumori ginecologici	0,92	19	15
Tumore alla vescica	0,70	15	0
Tumore al rene	0,19	4	0
Tumori ematologici			
Leucemia linfatica cronica	55,00	1139	17
Disordini mieloproliferativi	16,00	331	25
Mieloma multiplo	16,91	350	26
Linfoma non-Hodgink's	15,68	325	23
Linfoma di Hodgink	0,96	20	0
Leucemia acuta	12,50	259	29
Dialisi	17,42	361	17
Trapianto d'organo	7,91	164	6
Cirrosi	5,88	122	24
Gravidanza	5,60	116	31
Patologie infiammatorie			
Artrite reumatoide	2,71	56	19

Coliti ulcerative	2,63	54	13
Arterite temporale	17,62	365	13
Morbo di Crohn	1,98	41	0
HIV / AIDS	2,68	55	33
HIV positivo (no AIDS)	2,17	45	13
Diabete (totale)	0,14	3	14
Tipo 1	1,63	34	5
Tipo 2	0,20	4	10
Malattie cardiache	0,26	5	14
Casi senza le condizioni elencate sopra			
Età > 74 anni	0,96	20	16
Età 65–74 anni	0,38	8	10
Età < 65 anni	0,05	1	5
Popolazione generale	0,38		22

a: No. di casi per 100000 soggetti con condizioni di base

b: incidenza della listeriosi nel gruppo a rischio / incidenza della listeriosi nella popolazione <65 anni di età

c: percentuale

1.2.4 Patogenesi

Lm viene veicolata all'uomo attraverso il consumo di cibi contaminati. Di conseguenza il primo sito dell'organismo ospite con cui il batterio entra in contatto è il tratto gastrointestinale. Una volta ingerito, grazie all'azione di proteine di risposta allo stress, il microrganismo è in grado di resistere all'ambiente acido dello stomaco, agli enzimi proteolitici presenti nel tubo digerente dell'ospite e ai sali biliari nel duodeno [Dongyou Liu, 2005]. Superato lo stomaco e il primo tratto dell'intestino tenue, *Lm* comincia ad aderire all'epitelio intestinale a livello degli enterociti e delle cellule M, innescando in tempi molto rapidi il ciclo cellulare infettivo. Dapprima l'infezione è circoscritta all'epitelio della mucosa intestinale, in seguito, col passaggio del patogeno alla lamina propria e alla sottomucosa, l'infezione si estende ai macrofagi e alle placche di Peyer [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Ramaswamy V. et al, 2012].

Se *Lm* resta circoscritta al tratto intestinale la patologia si manifesta in forma gastroenterica. In questo caso il decorso clinico è benigno e abbastanza rapido, all'incirca 1-3 giorni. Quando invece il patogeno riesce a superare la barriera intestinale, viene traslocato al fegato, il suo primo organo *target*, dove comincia a moltiplicarsi [Ramaswamy V. et al, 2012]. Questa fase della patologia è subclinica e silente. Nel fegato, grazie al passaggio diretto da epatocita a epatocita, il microrganismo determina la formazione di focolai di infezione nel parenchima senza però entrare mai in contatto con gli effettori umorali del sistema immunitario [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001]. Durante le prime fasi della colonizzazione del fegato si innesca quindi una risposta immunitaria innata, che è essenziale per la sopravvivenza dell'ospite. Gli effettori coinvolti sono i macrofagi che permettono di controllare la fase acuta dell'infezione epatica attraverso la distruzione del patogeno. Solo successivamente si innesca una risposta immunitaria acquisita, mediata principalmente dai linfociti T, che garantisce il potenziamento della risposta all'infezione [Zenewicz L. A., Shen H., 2007; Pamer E. G., 2004; Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Ramaswamy V. et al, 2012].

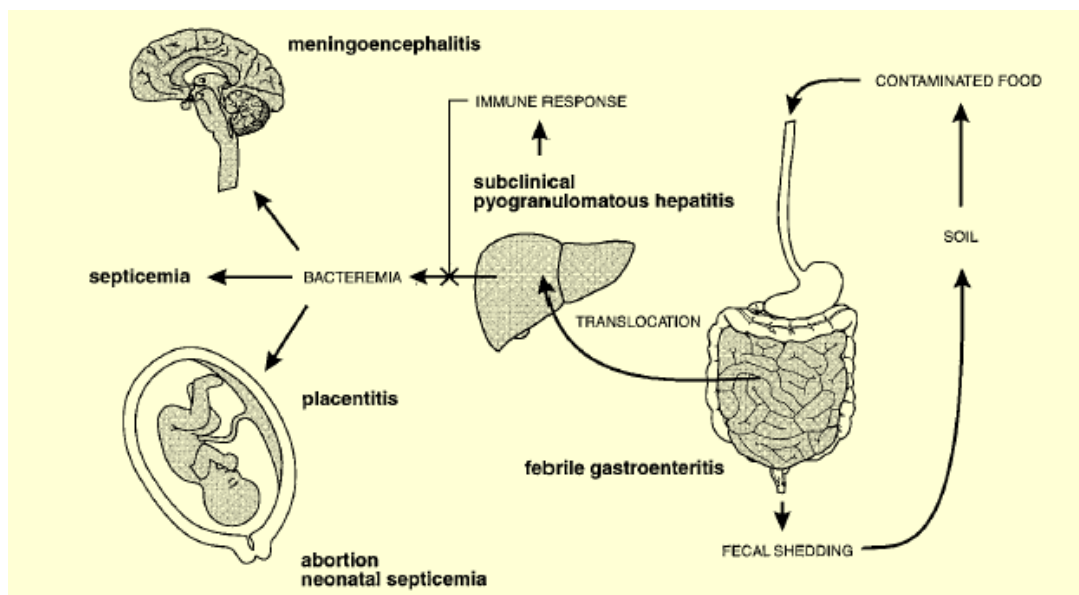


Figura 4: Rappresentazione schematica della fisiopatologia dell'infezione da parte di *Listeria* [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001]

Tuttavia, se la proliferazione del patogeno a livello del fegato non viene controllata bene, come spesso accade nei soggetti immunocompromessi, la proliferazione di *Lm* a livello del parenchima raggiunge un'entità tale da portare al rilascio del patogeno nel torrente circolatorio. Questo comporta l'insorgenza di setticemia e/o l'infezione secondaria di altri organi. Nonostante *Lm* sia un patogeno multisistemico, che può colonizzare una vasta gamma di tessuti, le principali forme cliniche di listeriosi invasiva non setticemica interessano l'utero gravido e il sistema nervoso centrale (Figura 4) [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Ramaswamy V. et al, 2012].

1.2.5 Clinica

La listeriosi è una patologia rara ma potenzialmente grave, associata ad un alto tasso di letalità [Allerberger F., Wagner M., 2010; Vazquez-Boland J. A. et al, 2001]. *Lm* causa tre forme di listeriosi, a seconda che il microrganismo infetti adulti immunocompetenti, adulti immunocompromessi e donne in gravidanza/neonati [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Slutsker L., Schuchat A., 1999]. Tuttavia, non bisogna dimenticare che *Lm* è presente nel tratto gastrointestinale di numerosi soggetti che non manifestano alcuna sindrome clinica: portatori asintomatici [Slutsker L., Schuchat A., 1999].

1.2.5.1 Portatori asintomatici

Il tratto intestinale dei soggetti adulti può essere colonizzato da *Lm*, questo batterio infatti, può essere rilevato nelle feci del 5-10% della popolazione sana [Hof H., 2001; Slutsker L., Schuchat A., 1999]. Non è ancora chiaro se la presenza del microrganismo nel tratto intestinale di questi soggetti dipenda da una propagazione di *Lm* protratta per lunghi periodi di tempo oppure sia legata alla continua esposizione del soggetto a cibi contaminati. La flora intestinale gioca un ruolo chiave nella regolazione della colonizzazione da parte del batterio. Si pensa infatti che le batteriocine, prodotte da lattobacilli, enterococchi e altri batteri gram positivi presenti in loco, gli acidi grassi volatili (acetato, propinato, butirrato), prodotti da altri batteri, e gli enzimi litici, secreti da alcuni microrganismi, siano tutti elementi critici per la riduzione della carica batterica di *Listeria* nell'intestino. A questi si aggiungono sistemi di difesa propri dell'ospite, lisozima, la fosfolipasi A2 intestinale e peptidi antimicrobici, localizzati sulla superficie mucosale, che possono contribuire a prevenire l'invasione della parete intestinale.

1.2.5.2 Listeriosi non-invasiva

Nei soggetti adulti immunocompetenti, a seguito dell'esposizione a cariche elevate, la listeriosi si manifesta in forma non invasiva inquadrabile come gastroenterite febbrile, riconosciuta solo all'inizio degli anni 2000 [Swaminathan B, Gerner-Smidt P., 2007; Vazquez-Boland J. A. et al, 2001]. I sintomi più frequentemente riportati sono febbre, diarrea, vomito, dolori addominali, artromialgia e mal di testa e possono protrarsi per 1-3 giorni fino a 1 settimana. Pochi casi necessitano di ospedalizzazione e sono prevalentemente bambini e anziani. Per di più queste forme gastroenteriche sono tipicamente prive di complicanze, anche perché quelle rare volte in cui si instaura batteriemia non si assiste alla comparsa di sepsi né a un'evoluzione letale della patologia [Ooi S. T., Lorber B., 2005]. Purtroppo le forme di listeriosi gastroenterica sono sotto documentate [Hof H., 2001] in quanto la capacità di rilevare questi casi, soprattutto se insorgono in forma non epidemica, è condizionata sia dallo scarso ricorso all'assistenza medica da parte dei soggetti coinvolti sia dalla non routinaria ricerca di *Lm* dall'esame colturale delle feci [Slutesker L., Schuchat A., 1999].

Oltre alla gastroenterite, un'altra forma non invasiva di listeriosi, è l'infezione della cute e delle congiuntive. Questa manifestazione può sporadicamente interessare operatori di laboratorio esposti al patogeno oppure soggetti che manipolano animali infetti (allevatori, veterinari, macellai) [Slutesker L., Schuchat A., 1999].

1.2.5.3 Listeriosi invasiva

La listeriosi invasiva si manifesta principalmente nei gruppi di popolazione a rischio, pur non mancando segnalazioni di casi di malattia anche tra i soggetti immunocompetenti, verosimilmente correlati all'assunzione di elevate cariche infettanti. Il periodo di incubazione del patogeno, prima che insorga la sintomatologia specifica, è molto lungo, tra i 30 e i 70 giorni. L'infezione sistemica da parte di questo patogeno comporta [Doganay M., 2003]:

- sepsi
- malattie del sistema nervoso centrale: meningiti, meningoencefaliti, ascessi;
- endocarditi e altre infezioni localizzate (epatiti, peritoniti, artriti, miocarditi, pericarditi, ecc.).

La sepsi si manifesta nel 21-43% dei casi [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Doganay M., 2003]. I pazienti affetti manifestano principalmente: febbre, malessere, affaticamento,

dolori e sintomi addominali [Roberts A. J., Wiedmann M., 2003]. Inoltre la malattia può progredire, portando a coaguli intravascolari diffusi, sindrome da distress respiratorio e insufficienza multi organica [Doganay M., 2003].

La meningite è la forma più frequente di listeriosi di interesse neurologico e tende a manifestarsi in forma sia acuta che subacuta. Il quadro clinico è generalmente associato a febbre, rigidità nucale, disordini nel movimento (tremore o atassia), alterazione dello stato mentale. *Lm* sembra essere responsabile di circa il 10% delle forme di meningite sviluppate a livello della popolazione. [Roberts A. J., Wiedmann M., 2003; Doganay M., 2003]. La meningoencefalite si manifesta generalmente in forma subacuta: la febbre, non sempre presente, è molto bassa, compaiono vomito, malessere generico, disturbi ai nervi cranici e atassia [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Doganay M., 2003]. Le encefaliti sono poco comuni nell'uomo e coinvolgono principalmente il romboencefalo [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001].

Le endocarditi e le infezioni focali sono conseguenti alla diffusione del batterio durante la fase di batteriemia [Doganay M., 2003], ma si manifestano raramente, nel 5-10% dei casi [Vazquez-Boland J. A. et al, 2001].

Al fine di migliorare la prognosi dei pazienti affetti da listeriosi invasiva, risultano fondamentali, nei gruppi ad alto rischio, la diagnosi precoce e il trattamento tempestivo della patologia [Bortolussi R., 2008].

1.2.5.4 Forme associate alla gravidanza

La listeriosi nelle gestanti o è asintomatica o si manifesta con una sintomatologia lieve, simile a quella influenzale [Bortolussi R., 2008; Lamont R. F. et al, 2011]. Al contrario, per il prodotto del concepimento, le conseguenze dell'infezione sono gravi; si può verificare aborto, parto prematuro, sepsi e morte fetale o neonatale [Jackson K. A. et al, 2010]. Le forme neonatali di listeriosi sono associate a polmonite, meningite e sepsi con sintomi che comprendono distress respiratorio, febbre, eruzioni cutanee, ittero e letargia. Il rilevamento di granulomatosi infantiseptica (microascessi e granulomi diffusi) permette la diagnosi certa della patologia [Kanakiraman V., 2008].

La listeriosi neonatale può essere di due tipi: a esordio precoce o tardivo. Nel caso dell'esordio precoce il bambino viene infettato durante la vita in utero per via transplacentare, oppure più raramente a causa della diffusione ascendente del batterio successiva a una colonizzazione vaginale. La patologia si manifesta entro 36 ore dalla

nascita ed è associata prevalentemente a sepsi [Slutesker L., Schuchat A., 1999; Lamont R. F. et al, 2011].

La listeriosi a esordio tardivo è molto rara. Si manifesta a partire da 5-7 giorni fino ad un mese dopo il parto e si presenta come malattia meningea. I bambini affetti da tale patologia generalmente sono nati sani e al termine della gestazione. La fonte di infezione in questo gruppo non è nota, tuttavia, poiché l'organismo è spesso isolato dal tratto genitale materno, è presumibile un'acquisizione durante il passaggio attraverso il canale del parto. Non bisogna tuttavia escludere l'infezione orizzontale a partire dall'ambiente oppure da soggetti portatori a stretto contatto col neonato [Swaminathan B, Gerner-Smidt P., 2007; Vazquez-Boland J. A. et al, 2001; Kanakiraman V., 2008].

Nelle donne in gravidanza la listeriosi sembra essere 18 volte più frequente rispetto al resto della popolazione adulta, con un'incidenza del 12/100.000 [Lamont R. F. et al, 2011]. Tuttavia è molto probabile che il problema sia sottostimato, dal momento che non sono effettuati di routine esami colturali sui feti abortiti e i bambini nati morti. Coscienti del fatto che, in questa categoria a rischio, la patologia può essere prevenuta e curata con successo, appare di primaria importanza non solo la messa a punto di un sistema di educazione alimentare delle gestanti, per ridurre l'incidenza della patologia, ma anche la promozione di una diagnosi precoce, per permettere trattamenti antibiotici che risulterebbero salvifici per il feto e il neonato [Jackson K. A. et al, 2010; Slutesker L., Schuchat A., 1999].

1.2.6 Accertamento diagnostico

Nelle forme gastroenteriche di listeriosi, la diagnosi avviene col rilevamento del patogeno nelle feci, dove può essere individuato fino a 2 settimane dall'inizio della sintomatologia [Ooi S. T., Lorber B., 2005]. Per isolare il microrganismo da campioni fecali, dove si trovano numerosi microrganismi competitori, è importante effettuare un arricchimento prima di procedere alla coltura selettiva. Il metodo più efficace è il mantenimento del campione a temperature di 4°C, in modo da promuovere unicamente la crescita di *Lm*, sfruttando il fatto che gli altri microrganismi non crescono a queste temperature [Allerberger F., Wagner M., 2010; Lamont R. F. et al, 2011; Slutesker L., Schuchat A., 1999].

La diagnosi di listeriosi invasiva e delle forme associate alla gravidanza avviene attraverso l'isolamento di *Lm* da un sito normalmente sterile. I campioni, prevalentemente sangue, liquor cefalorachidiano, liquido amniotico, tampone all'orecchio

dei neonati, vengono direttamente seminati su terreni selettivi e arricchiti. In questi casi l'utilizzo dei campioni fecali e di tamponi vaginali materni non è di aiuto nella diagnosi dal momento che i portatori asintomatici del patogeno sono molto frequenti [Allerberger F., Wagner M., 2010; Slutsker L., Schuchat A., 1999; Kanakiraman V., 2008].

Una volta isolato il microrganismo, l'identificazione avviene con il test di Gram, che deve essere positivo, l'osservazione della motilità, "tumbling", e il test per la catalasi, che deve essere positivo [Wellinghausen N., 2011].

Per una diagnosi più rapida di tutte e tre le forme di listeriosi, ci si può affidare sia alla PCR che ad analisi sierologiche per gli anticorpi contro la listeriolisina O, il principale fattore di virulenza di *Lm* [Allerberger F., Wagner M., 2010; Lamont R. F. et al, 2011; Slutsker L., Schuchat A., 1999; Ooi S. T., Lorber B., 2005].

1.2.7 Terapia

Il trattamento antibiotico raccomandato include l'uso di ampicillina e penicillina come farmaci di elezione. L'ampicillina può essere associata alla gentamicina, soprattutto nei pazienti affetti da sepsi, ma è controindicata nelle donne in gravidanza, a causa degli effetti teratogeni del farmaco [Allerberger F., Wagner M., 2010, Bortolussi R., 2008]. Per questa categoria di pazienti si tende a utilizzare l'eritromicina. Anche il trattamento con sulfamidico associato al trimetoprim è efficace nei confronti di *Lm* e viene normalmente utilizzato per i pazienti allergici alla penicillina [Slutsker L., Schuchat A., 1999; Conter M. et al, 2008].

La risposta di *Lm* ai trattamenti tende a essere lenta, a causa della capacità del microrganismo di crescere e sopravvivere all'interno della cellula. Per questa ragione i periodi di trattamento antibiotico sono prolungati: 3-6 settimane per gli immunocompromessi, 2 settimane per le donne in gravidanza, 2-3 settimane per i neonati, 2-4 per pazienti non immunocompromessi affetti da sepsi e meningiti [Slutsker L., Schuchat A., 1999].

1.3 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia della listeriosi

Lm è ritenuto uno dei più importanti *foodborne-pathogen* soggetti ad attività di sorveglianza. Questo potrebbe stupire se si considerano alcune caratteristiche del microrganismo e della patologia. In prima istanza i focolai epidemici dovuti a questo patogeno non sono tanto comuni quanto quelli associati a *Salmonella* e *Campylobacter*.

Secondariamente per ogni evento epidemico di listeriosi, il numero di casi associati risulta limitato. Infine molti dei casi di listeriosi rilevati sono considerati sporadici poiché non si riesce a trovare una chiara connessione ad alcun *outbreak*. Nonostante ciò, l'attenzione delle autorità sanitarie verso *L. monocytogenes* è più che giustificata dal fatto che la listeriosi può manifestarsi con una sintomatologia molto grave (meningite e setticemia) ed è associata a un tasso di letalità elevato, 20-30% [Hedberg C., 2006; Newell D. G. et al, 2010].

Di particolare interesse è il fatto che questo microrganismo sia classificato come un patogeno emergente. La sua frequenza, infatti, è andata aumentando nel corso degli ultimi decenni, molto probabilmente a causa dei cambiamenti delle condizioni igienico sanitarie, della modificazione delle abitudini alimentari della popolazione e dell'aumento della percentuale di soggetti con fattori predisponenti alla patologia [Newell D. G. et al, 2010].

Nei Paesi industrializzati i sistemi di sorveglianza della listeriosi sono stati sviluppati a partire dal 1987, a seguito degli *outbreak* che dimostrarono la trasmissione alimentare del patogeno. I sistemi di sorveglianza europei sono passivi, si basano cioè sulla notifica dei casi di listeriosi, confermati con l'isolamento del patogeno da un sito normalmente sterile. A questi sistemi di segnalazione si aggiungono spesso sistemi di sorveglianza basati sulle attività di laboratorio che consentono di migliorare la capacità di riconoscimento degli *outbreak* attraverso la tipizzazione dei ceppi coinvolti [Rocout J. et al, 2000]. Negli USA accanto ai sistemi di sorveglianza basati sulla segnalazione dei casi, è stato implementato a livello nazionale *FoodNet*, un sistema di sorveglianza attivo della listeriosi e delle altre malattie a trasmissione alimentare (MTA), che contatta regolarmente i diversi laboratori per identificare tutti i casi di listeriosi e di altre forme di MTA confermati dall'analisi colturale [CIFOR-Guidelines for foodborne disease outbreak response, Chapter 2; Rocout J. et al, 2000].

- È importante ricordare che in qualsiasi sistema di sorveglianza si tende a sottostimare l'incidenza della patologia [Maertens de Noordhout Cet al, 2014] (Figura 5) Le ragioni sono molteplici:
- alcune persone non ricorrono alle cure mediche nel caso di diarrea e vomito di durata limitata;
- i medici non sempre richiedono test diagnostici;
- non tutti i tipi di infezione possono essere diagnosticati con i test routinari di laboratorio;

- i casi non sempre sono notificati alle autorità sanitarie per negligenza dei laboratori e dei medici [Annual Epidemiological Report – 2012];

Il risultato è una perdita di casi rilevati a ogni step del processo di segnalazione (Figura 5). Per ogni caso notificato, ce ne sono moltissimi che non sono rilevati e che quindi non possono essere inclusi nelle statistiche nazionali, internazionali e mondiali [CIFOR-Guidelines for foodborne disease outbreak response, Chapter 2].



Figura 5: Piramide della sorveglianza della listeriosi.

Negli Stati Uniti l'incidenza complessiva della listeriosi è cambiata significativamente tra il 1989 e il 2000, grazie alla messa in atto di sistemi di prevenzione a livello industriale, regolamentare e educativo. Nel 1989 fu documentata un'incidenza media pari a 0,79 casi per 100.000 abitanti, che successivamente è diminuita di circa due terzi, raggiungendo un valore medio di 0,28 casi/100.000 abitanti nel 2000 [Silk B. J. et al, 2012]. Dal 2004 al 2012, non sono state rilevate importanti variazioni nell'incidenza della patologia che è oscillata da un minimo di 0,20 casi/100.000 abitanti a un massimo di 0,34 casi/100.000 abitanti [Hedberg C., 2006; FoodNet Reports; Goulet V. et al, 2008].

In Europa, secondo i dati dell'Eurostat, dal 1995 al 1998 c'è stato un decremento dell'incidenza della listeriosi che poi è tornata ad aumentare per raggiungere, nel 2004, un valore analogo a quello del 1995: 0,28 casi/100.000 abitanti (Figura 6) [*Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2007*]. In Europa dalla metà degli anni '90 ai primi anni 2000 è stato documentato un aumento dell'incidenza della patologia, in parte dovuto all'aumento della frazione di popolazione a rischio e in parte al miglioramento della sensibilità dei sistemi di sorveglianza [Hedberg C., 2006; Muñoz P. et al, 2012]. Infatti nel 2002, i valori di incidenza più alti erano stati rilevati in quei Paesi in cui la notifica della patologia era obbligatoria e dove erano presenti dei sistemi di sorveglianza basati sull'attività di un laboratorio nazionale di riferimento. La relazione positiva tra l'investimento nelle attività di sorveglianza e l'incremento dei casi riportati, è stata dimostrata nei Paesi Bassi, dove, a seguito dell'implementazione di un sistema di sorveglianza attivo nel gennaio 2005, si è assistito a un incremento dell'incidenza del 43% [Hedberg C., 2006].

A partire dal 2005, anno della nascita dell'*European Center for Disease Prevention and Control*, i dati sulle malattie infettive nei Paesi europei sono stati raccolti, analizzati, interpretati ed annualmente pubblicati attraverso un sistema di sorveglianza centralizzato (TESSy). Da tali report risulta che l'incidenza della listeriosi in Europa dal 2005 al 2011, si è mantenuta a livelli più o meno costanti, tra 0,30 e 0,37 casi/100.000 abitanti (Figura 6) [The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2007; Annual Epidemiological Report – 2012].

Nell'ultimo decennio è stato rilevato un aumento dell'incidenza della listeriosi solo in alcune nazioni dell'UE (Tabella 2), per esempio in Francia dal 2005 al 2007, nei Paesi Bassi dal 2008 al 2011, in Danimarca dal 2005 al 2009. La ragione di questo andamento non è del tutto chiara. Sicuramente non è attribuibile ad un artefatto dei sistemi di sorveglianza della listeriosi. Sembrano invece giocare un ruolo importante i cambiamenti nella dieta e nella preparazione degli alimenti, come per esempio l'aumento del consumo dei prodotti *ready-to-eat* e la riduzione del contenuto di sale in quegli stessi prodotti, che se da un lato contrasta il problema dell'ipertensione dall'altro favorisce la contaminazione da parte di *Lm*. Come già detto, è stato inoltre registrato un aumento dei soggetti suscettibili, come i soggetti leucemici, che tra l'altro hanno una aspettativa di vita sempre più lunga, quindi sopravvivono per lungo tempo in queste condizioni. Infine sono stati identificati altri due fattori che potrebbero contribuire a un incremento dell'incidenza della

patologia: l'aumento della capacità di diagnosi e l'aumentato utilizzo degli inibitori della pompa protonica negli anziani [Goulet V. et al, 2008, Muñoz P. et al, 2012;]

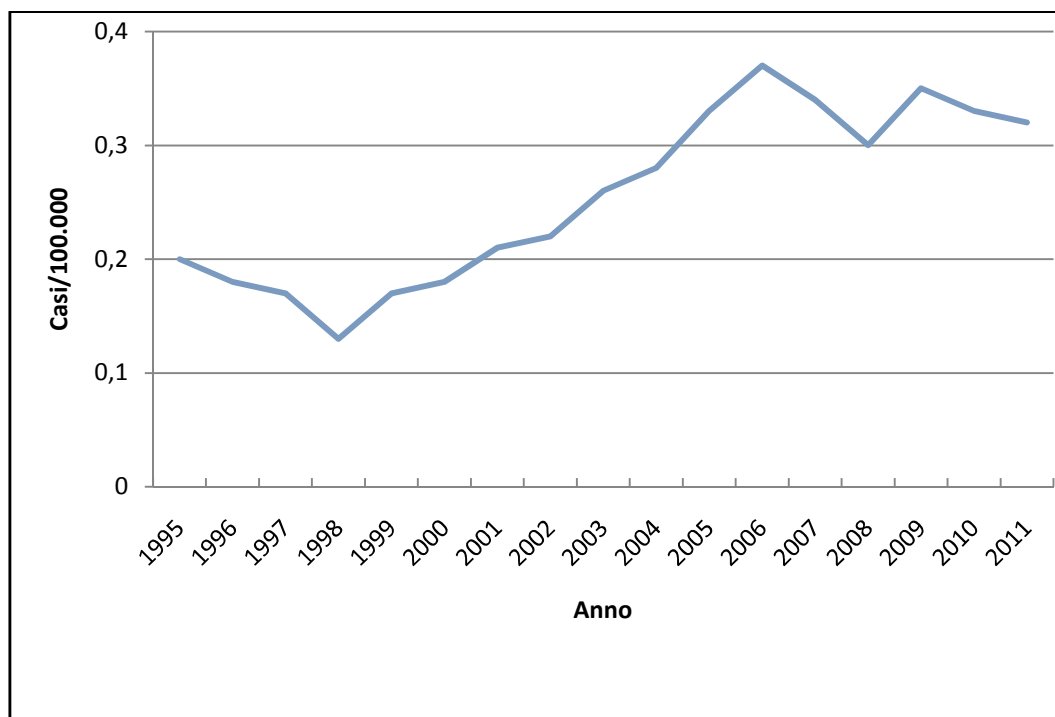


Figura 6: Incidenza della listeriosi in Europa dal 1995 al 2004 [Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2007; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; Annual Epidemiological Report – 2012]

L'incidenza media della patologia nell'Unione Europea è di 0,44 casi per 100.000 abitanti nel 2013, con il più alto tasso di notifica in Finlandia, Spagna, Svezia e Danimarca (rispettivamente 1,12, 1,00, 0,97 e 0,91 casi/100.000 abitanti). Il più basso tasso di notifica è stato riportato in Bulgaria, Romania e Grecia (0,04, 0,05 e 0,09 casi/100.000 abitanti rispettivamente). I dati risultano essere mancanti per Italia e Portogallo.

La listeriosi in Europa presenta un andamento stagionale, evidente in particolar modo negli anni 2009 e 2013, con un maggior numero di casi riportati in estate e picchi più bassi in inverno. Si riporta inoltre un incremento statisticamente significativo ($p=0.018$) dei casi totali di listeriosi (Figura 7) [EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013; Annual Epidemiological Report – 2012; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011].

In base al report EFSA/ECDC, nel 2013 27 stati membri hanno riportato 1.763 casi confermati di listeriosi, con un incremento del 8,6% rispetto all'anno precedente.

Nel 2013 in base ai dati sull'ospedalizzazione raccolti in TESSy per gli ultimi due anni, circa il 99,1% di casi sono stati ospedalizzati. 19 Stati membri hanno riportato un totale di 191 morti dovute a listeriosi con un tasso di letalità è del 15,6% [The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015].

Nel report sopracitato non sono riportati i dati relativi alla distribuzione in base all'età, che però è possibile ricavare per l'anno 2010 nel report ECDC del 2012. In base a questo documento l'incidenza della listeriosi è maggiore nei soggetti con età > 65 anni, seguiti da bambini di età compresa tra gli 0 e i 4 anni [Annual Epidemiological Report – 2012]. Questi dati sono in accordo col *trend* attuale che vede un aumento dell'incidenza della listeriosi tra i soggetti ultrasessantenni [Muñoz P. et al, 2012] e ad una riduzione dei casi materno/neonatali [Goulet V. et al, 2008].

Sempre in base al report ECDC il rapporto tra uomini e donne colpite dalla patologie è di 1,2:1, con predominanza di casi negli uomini di età compresa tra i 45 e i 65 anni e oltre i 65 anni e nelle donne di età compresa tra i 25 e i 44 anni [Annual Epidemiological Report – 2012].

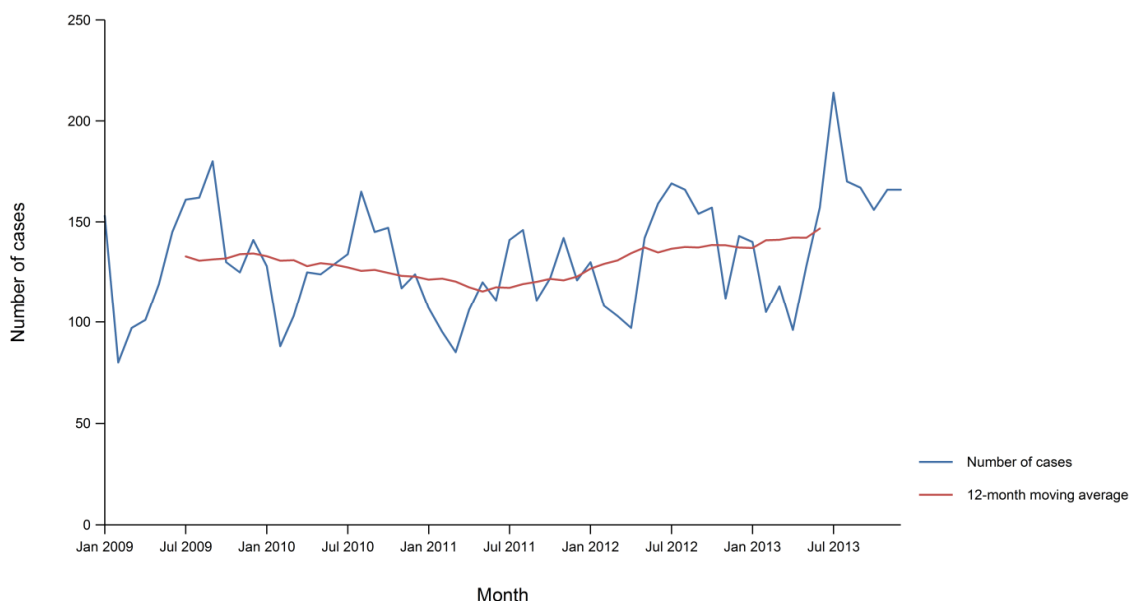


Figura 7: Andamento stagionale dei casi di listeriosi confermati nei Paesi dell'UE/EEA tra il 2006 e il 2010 [Annual Epidemiological Report – 2015]

Tabella 2: Casi riportati e tasso di notifica per 100,000 di listeriosi nell'Unione Europea , 2009-2013 [EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013].

Country	2013			2012		2011		2010		2009			
	National Coverage ^(a)	Data Format ^(a)	Total Cases	Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates			
				Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate
Austria	Y	C	36	36	0.43	36	0.43	26	0.31	34	0.41	46	0.55
Belgium	Y	C	66	66	0.59	83	0.75	70	-	40	0.37	58	-
Bulgaria	Y	A	3	3	0.04	10	0.14	4	0.05	4	0.05	5	0.07
Croatia ^(b)	Y	A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyprus	Y	C	1	1	0.12	1	0.12	2	0.24	1	0.12	0	0.00
Czech Republic	Y	C	36	36	0.34	32	0.31	35	0.33	26	0.25	32	0.31
Denmark	Y	C	51	51	0.91	50	0.90	49	0.88	62	1.12	97	1.76
Estonia	Y	C	2	2	0.15	3	0.23	3	0.23	5	0.38	3	0.23
Finland	Y	C	61	61	1.12	61	1.13	43	0.80	71	1.33	34	0.64
France	Y	C	369	369	0.56	348	0.53	282	0.43	312	0.48	328	0.51
Germany	Y	C	467	462	0.57	412	0.51	330	0.41	377	0.46	394	0.48
Greece	Y	C	10	10	0.09	11	0.10	10	0.09	10	0.09	4	0.04
Hungary	Y	C	48	48	0.49	13	0.13	11	0.11	20	0.20	16	0.16
Ireland	Y	C	8	8	0.17	11	0.24	7	0.15	10	0.22	10	0.22
Italy ^(c)	-	-	-	-	-	36	-	129	0.22	157	0.27	109	0.19
Latvia	Y	C	5	5	0.25	6	0.29	7	0.34	7	0.33	4	0.19
Lithuania	Y	C	6	6	0.20	8	0.27	6	0.20	5	0.16	5	0.16
Luxembourg	Y	C	2	2	0.37	2	0.38	2	0.39	0	0.00	3	0.61
Malta	Y	C	1	1	0.24	1	0.24	2	0.48	1	0.24	0	0.00
Netherlands	Y	C	72	72	0.43	73	0.44	67	0.52	72	0.43	44	0.27
Poland	Y	C	58	58	0.15	54	0.14	62	0.16	59	0.16	32	0.08
Portugal ^(d)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Romania	Y	C	9	9	0.05	11	0.06	1	0.01	6	0.03	6	0.03
Slovakia	Y	C	18	18	0.30	11	0.20	31	0.58	5	0.09	10	0.19
Slovenia	Y	C	16	16	0.78	7	0.34	5	0.24	11	0.54	6	0.30
Spain ^(e)	N	C	140	140	1.00	109	0.93	91	0.78	129	1.11	121	1.05
Sweden	Y	C	93	93	0.97	72	0.76	56	0.60	63	0.67	73	0.79
United Kingdom	Y	C	192	192	0.30	183	0.29	164	0.26	176	0.28	235	0.38
EU Total	-	-	1771	1763	0.44	1644	0.41	1515	0.33	1663	0.37	1675	0.37
Iceland	Y	C	1	1	0.31	4	1.25	2	0.63	1	0.32	0	0.00
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Norway	Y	C	21	21	0.42	30	0.60	21	0.43	22	0.45	31	0.65
Switzerland ^(f)	Y	C	64	64	0.80	39	0.49	47	0.60	67	0.86	41	0.53

(a): Y, yes; N, no; A, aggregated data; C, case-based data; -, no report.

(b): Case of unknown case classification.

(c): No report for 2013 and provisional data for 2012.

(d): No surveillance system.

(e): Sentinel system; notification rates calculated with an estimated population coverage of 30 % in 2013 and 25 % in 2009-2012.

(f): Switzerland provided data directly to EFSA.

Tornando al report EFSA/ECDC, 25 Stati membri e due Paesi non appartenenti all'UE nel 2013 hanno riportato dati riguardanti la prevalenza di *Lm* negli alimenti, osservati con l'analisi di un grande numero di campioni e categorie alimentari. Il report EFSA/ECDC del 2013 si focalizza solo sui cibi *ready-to-eat*, in quanto alimenti ad alto rischio di contaminazione. I più alti livelli di non conformità riguardano i prodotti RTE ittici, per i campioni raccolti a livello del processamento, e formaggi ad bassa stagionatura e salsicce, per i campioni raccolti a livello della vendita al dettaglio (Figura 8) [The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013].

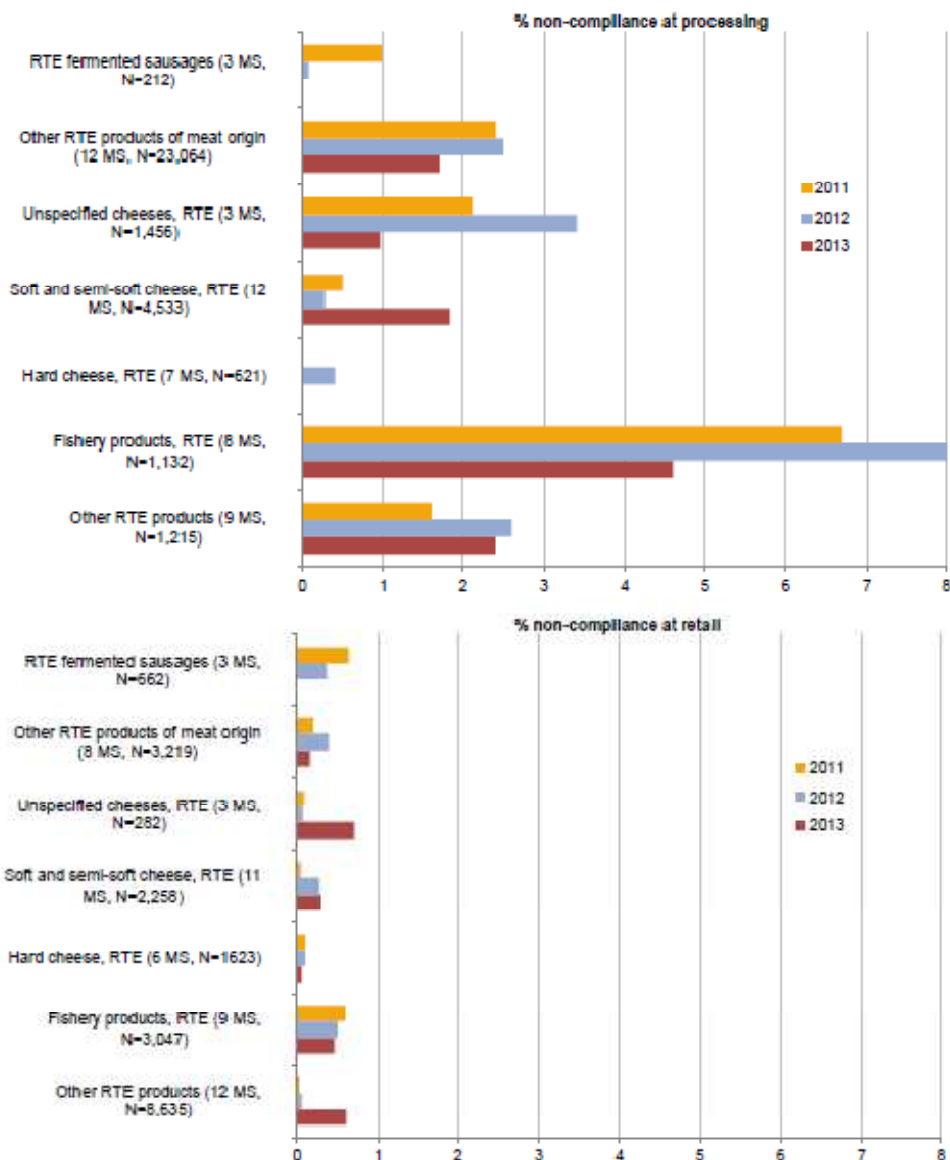


Figura 8: Percentuale di non conformità di singoli campioni ottenuti a livello del processamento e della vendita al dettaglio, 2011-2013 [EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013].

Nel 2013 sono stati riportati sette *outbreak* di listeriosi da cinque Stati membri dell'Unione Europea con una forte correlazione ad alimenti. Questi *outbreak* hanno coinvolto 51 casi umani, 14 ospedalizzazioni di cui 3 con esito letale. Tre *outbreak* sono stati correlati a prodotti ittici, mentre i restanti *outbreak* gli alimento responsabili del contagio sono stati formaggi, prodotti alimentari a base di carne, vegetali e alimenti misti [EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2015].

Complessivamente nei Paesi sviluppati, dove l'andamento della patologia è ben documentato e dove sono state implementate normative per il suo controllo, l'incidenza della listeriosi è molto simile e si assesta a valori compresi tra 0,3 e 0,7 casi/100000 abitanti, che, sebbene moderati, risultano ancora inaccettabili per le autorità di sanità pubblica, a causa della gravità del quadro clinico e dell'elevato tasso di letalità associato alla patologia. Persiste quindi l'obiettivo di ridurre l'incidenza della malattia attraverso il miglioramento o l'implementazione di nuove regolamentazioni e linee guida per le industrie, e attraverso strategie educative rivolte ai consumatori, con particolare attenzione alle categorie a rischio [Todd E. C. D., Notermans S., 2011].

L'importanza della listeriosi nei Paesi in via di sviluppo non è stata determinata. Al momento questa patologia non sembra avere una priorità rispetto ad altri problemi di Sanità Pubblica. Tuttavia anche in questi paesi *Lm* potrebbe diventare un importante patogeno nel momento in cui verranno acquisiti i costumi alimentari occidentali che prevedono un alto consumo di prodotti RTE e la loro conservazione nei frigoriferi [Todd E. C. D., Notermans S., 2011].

Esiste una discordanza sostanziale tra l'incidenza di listeriosi registrata in Italia e quella registrata nel resto dell'Europa e questo dato fa ipotizzare 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. 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 (Pontello et al., 2012).

1.4 Tipizzazione intraspecifica ed epidemiologia molecolare

Le difficoltà associate alle indagini epidemiologiche sui casi di listeriosi dipendono da diversi fattori: la lunga *shelf-life* degli alimenti coinvolti (formaggi, affettati, salmone affumicato, prodotti RTE) e la loro commercializzazione su larga scala; la comparsa di malattia severa solo in numero ristretto di soggetti esposti; il lungo periodo di incubazione del patogeno nelle forme invasive. Ne deriva che per la listeriosi, ancor più che per le altre malattie a trasmissione alimentare, il contributo delle analisi microbiologiche risulta decisivo [Jadhav S. et al, 2012]. Le tecniche di sub tipizzazione sono di grande aiuto in quanto consentono di caratterizzare gli isolati clinici, di

evidenziare la presenza di *cluster*, di confermare o escludere l'associazione con prodotti alimentati sospetti e di risalire all'origine della contaminazione del prodotto lungo la catena alimentare [Dongyou Liu, 2005; Wiedmann M., 2002].

Sulla base delle caratteristiche fenotipiche e genotipiche gli isolati appartenenti alla specie di *Lm* possono essere classificati in "tipi" differenti (tipizzazione intraspecifica). L'utilità di questi sistemi è innegabile in quanto contribuiscono alle indagini sugli eventi epidemici e ad una più efficace pianificazione di programmi di controllo e prevenzione della patologia [Jadhav S. et al, 2012].

1.4.1 Tipizzazione fenotipica

La sierotipizzazione è una tecnica classica per la differenziazione degli isolati della stessa specie batterica ed è utilizzata per molti patogeni a trasmissione alimentare: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, etc. . Questa tecnica sfrutta il differente corredo degli antigeni di superficie degli isolati di *L. m.* che può essere rilevato grazie ad antisieri [Wiedmann M., 2002]. In base all'antigene somatico (O) e flagellare (H), è possibile classificare questa specie in 13 sierotipi (Tabella 3) [Dongyou Liu, 2005]. I ceppi implicati nei casi di infezione umana appartengono prevalentemente ai sierotipi 1/2a, 1/2b, 4b e 4c [Mammina C. et al, 2013]. La sierotipizzazione è stata ampiamente utilizzata negli studi epidemiologici, tuttavia ha lo svantaggio di avere un basso potere discriminante, soprattutto se confrontata con metodiche genetiche che riescono a individuare centinaia di sottotipi del patogeno [Wiedmann M., 2002; Jadhav S. et al, 2012]. Dunque la sierotipia da sola risulta limitativa per una corretta indagine epidemiologica, per meglio identificare le fonti di contaminazione e gli *outbreak* di listeriosi risulta necessario affiancarla a dei sistemi di tipizzazione maggiormente discriminanti [Wiedmann M., 2002]. Non a caso quindi la sierotipizzazione viene utilizzata prevalentemente per uno *screening* immediato e rapido dei gruppi di ceppi isolati durante un sospetto *outbreak*. Grazie alle informazioni ottenute con questa metodica è possibile eliminare in tempi rapidi tutti gli isolati che non sono parte di quell'*outbreak*, facilitando un'applicazione mirata di sistemi di tipizzazione maggiormente sensibili ed efficienti, ma molto più dispendiosi [Graves L. M., 2007].

La tipizzazione fagica è un'altra tecnica utilizzata per la tipizzazione fenotipica di *Lm* e sfrutta la suscettibilità dei vari ceppi batterici alla lisi da parte di uno specifico set di batteriofagi. Questo tipo di analisi permette una tipizzazione dalle alte prestazioni, ma è

una procedura che è affetta da una grande variabilità biologica e sperimentale che rende difficile la standardizzazione dei risultati [Dongyou Liu, 2005; Wiedmann M., 2002].

Tra le tecniche di tipizzazione fenotipica ricordiamo anche la MLEE, Multilocus enzyme electrophoresis che permette di differenziare ceppi di *Lm* sfruttando la mobilità elettroforetica di enzimi costitutivi, ciascuno dei quali è presente in questa specie batterica in diverse varianti. Questa tecnica a un buon potere discriminare, tuttavia soffre di una scarsa riproducibilità e standardizzazione [Jadhav S. et al, 2012; Wiedmann M., 2002].

L'utilizzo di test di suscettibilità agli antimicrobici per la tipizzazione intraspecifica di *Lm* ha avuto una limitata applicabilità, dal momento che questo batterio risulta sensibile agli antibiotici in maniera abbastanza uniforme [Graves L. M., 2007].

Tabella 3: Composizione degli antigeni somatici (O) e flagellari (H) nei sierotipi di *Listeria monocytogenes* e classificazione sviluppata da Seeliger e Jones [Dongyou Liu, 2005]

Sierotipo	Antigene O	Antigene H
1/2a	I, II	A, B
1/2b	I, II	A, B, C
1/2c	I, II	B, D
3a	II, IV	A, B
3b	II, IV	A, B, C
3c	II, IV	B, D
4a	(V), VII, IX	A, B, C
4b	V, VI	A, B, C
4c	V, VII	A, B, C
4d	(V), VI, VIII	A, B, C
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C

1.4.2 Tipizzazione genetica

Sebbene i metodi di tipizzazione convenzionali abbiano ancora una certa utilità, nel tempo sono stati sempre più sostituiti dalle tecniche di tipizzazione genetica, la cui

capacità di differenziare e tipizzare ceppi batterici risulta molto elevata ed è associata a un buon livello di standardizzazione e riproducibilità [Wiedmann M., 2002].

La PFGE è il metodo *gold standard* per la tipizzazione di *Lm*. Si basa sull'estrazione dell'intero genoma batterico e sulla sua restrizione in 8-25 frammenti abbastanza grandi (lunghezza compresa tra le 40 e le 600 Kb). I frammenti vengono separati in base alla loro lunghezza grazie all'elettroforesi in campo pulsato e i profili che si ottengono sono quindi classificati in diversi pulsotipi [Dongyou Liu, 2005; Jadhav S. et al, 2012]. Lo svantaggio di questa tecnica è che richiede endonucleasi di restrizione molto costose, una grande abilità di laboratorio e un'apparecchiatura specifica. È inoltre una tecnica laboriosa, protratta nel tempo (72 ore di analisi) e sensibile anche a minimi cambiamenti delle condizioni sperimentali. D'altra parte però i vantaggi della PFGE sono considerevoli, essendo questa una tecnica molto discriminante in grado di rilevare modificazioni genetiche dovute a mutazioni, inserzioni, delezioni e trasposizioni. Negli Usa e poi anche in Europa ad opera del CDC ed eCDC rispettivamente è stato sviluppato il sistema PulseNet, un network di laboratori che utilizzano proprio la PFGE per la tipizzazione intraspecifica di patogeni alimentari, tra cui *Lm* [Jadhav S. et al, 2012]. La ribotipizzazione è un'altra tecnica di tipizzazione molecolare basata sulla restrizione del DNA in molti frammenti (300-500) di piccole dimensioni (2-20 Kbasi) [Wiedmann M., 2002]. I profili ottenuti sono quindi sottoposti alla Southern blot per rilevare e marcare le sequenze che ibridano con sonde per l'rRNA. La classificazione dei ceppi avviene quindi sulla base del ribopattern ottenuto [Jadhav S. et al, 2012]. Il ribotyping ha un potere discriminante paragonabile all'MLEE ed è stato frequentemente utilizzato per la tipizzazione di *Lm*. I vantaggi di questa metodica sono l'alta riproducibilità e il fatto di non necessitare di un'attrezzatura specifica, mentre il suo limite è l'incapacità di differenziare bene i ceppi appartenenti ai sierotipi 1/2d e 4b [Dongyou Liu, 2005; Jadhav S. et al, 2012].

Il sequenziamento del DNA a livello di uno o più geni specifici è sempre più utilizzato per la tipizzazione intraspecifica di *Lm* [Dongyou Liu, 2005]. Nell'MLST (Multilocus Sequence Typing) e nella MVLST (Multi Virulence Locus Sequence Typing) diversi loci genici del genoma batterico sono selezionati e amplificati con la PCR e analizzati in base alle differenze nella sequenza nucleotidica utilizzando il sequenziamento automatizzato [Jadhav S. et al, 2012]. Questo tipo di analisi sfrutta la presenza in questi loci di geni *housekeeping* (MLST) o geni di virulenza (MVLST) caratterizzati da un alto polimorfismo [Wiedmann M., 2002]. L'MLST e MVLST sono utilizzate per la subtipizzazione di *Lm*, ma

non solo. Consente infatti di ricostruire anche la relazione ancestrale ed evolutiva che intercorre tra diversi ceppi identificati. Rispetto al ribotyping e alla PFGE, queste tecniche sono meno ambigue e più facili da interpretare. Inoltre, grazie ad una banca data in cui sono stati inseriti tutti i *Sequence Type* di *Lm* rilevati a livello mondiale (*Listeria monocytogenes* MLST Database, Institut Pasteur), è possibile rilevare correlazioni tra più ceppi su larga scala. Con il fatto che i costi del sequenziamento del DNA stanno diminuendo rapidamente, questa tecnica giocherà un ruolo sempre più importante nella tipizzazione intraspecifica di *Lm* e negli studi filogenetici [Dongyou Liu, 2005].

1.4.3 Modelli applicati all'epidemiologia molecolare

La storia della MLST inizia con la multi locus enzyme electrophoresis (MLEE), la quale è una metodica di tipizzazione fenotipica che è stata utilizzata con successo per comprendere l'evoluzione di molti organismi eucarioti e procarioti (Selander et al., 1986; Boerlin and Piffaretti, 1991). La MLEE permette di differenziare ceppi di *L. monocytogenes* sfruttando la mobilità elettroforetica di enzimi costitutivi. Poiché questa specie batterica presenta enzimi multipli, con questa tecnica è possibile discriminare un grande numero di ceppi (18 *electrophoretic type* di *L. monocytogenes*). La metodica è simile alla PFGE e al ribotyping però soffre di una scarsa riproducibilità e standardizzazione, è laboriosa ed è meno discriminante rispetto ai sistemi di tipizzazione molecolare. Tuttavia trova una certa applicazione perché risulta economica e non tecnicamente complicata [Jadhav et al, 2012; M. Wiedmann, 2002]. Uno dei limiti di questa metodica di subtipizzazione basata sull'analisi di frammenti, così come la PFGE, consiste nella difficoltà di comparazione del dato tra i diversi laboratori. Per superare questi limiti della MLEE, Maiden et al. svilupparono la MLST attraverso l'analisi delle sequenze di DNA dei geni housekeeping al fine di studiare la struttura della popolazione del patogeno Gram-negativo *Neisseria meningitidis* [Maiden et al., 1998]. Da quel momento in poi, la MLST è stata applicata per elucidare la genetica di popolazione di molti altri batteri patogeni [Ochman and Bergthorsson, 1998; Enright et al., 2000; Kotetishvili et al., 2006; Meinersmann et al., 2004; Lemée et al., 2005; Pérez-Losada et al., 2006; Ragon et al., 2008; Cantinelli et al., 2013]. La MLST ha molti vantaggi rispetto ad altre metodiche di fingerprinting, infatti identificando gli alleli direttamente dalle sequenze nucleotidiche ne deriva un dato "portabile" con molte variazioni e con molte meno ambiguità [Maiden et al., 1998].

Molti e differenti schemi di MLST, a volte non basati sui geni housekeeping, sono stati sperimentati successivamente all'introduzione di questa metodica. A seconda dei markers selezionati, questi schemi mostrano differenti livelli di risoluzione filogenetica [Chen and Knabel, 2008]. I geni housekeeping per la MLST sono stati selezionati per i seguenti criteri: si trovano in tutti gli organismi, sono altamente conservati, si evolvono per selezione neutra ed evoluzione verticale. Il sequenziamento dei geni housekeeping ha superato alcune limitazioni presenti in altri metodi di sub-tipizzazione come l'inadeguata discriminazione, la scarsa riproducibilità, l'incapacità di quantificare geneticamente la relazione tra isolati non correlati e la difficoltà di comparazione dei risultati tra laboratori diversi [Maiden et al., 1998].

Sulla base dei risultati MLST usando i geni housekeeping, Spratt e Maiden (1999) proposero un modello sull'evoluzione nel quale uno specifico ST definito "*founder*" altamente adattato e con una spiccata capacità di causare malattie emerge come un clone epidemico dominando la popolazione. Successivamente, altri autori utilizzando i dati MLST costruirono un modello per la struttura epidemica della popolazione composta da due parti [Smith, Feil and Smith, 2000]. La prima parte consiste in una popolazione di sfondo composta da un grande numero di genotipi rari e non correlati, i quali sono ricombinanti ad alta frequenza. Questo sfondo è sovrastrato da un limitato numero di genotipi molto frequenti, o clusters di genotipi correlati denominati Clonal Complexes (CC). I CCs sono stati definiti come ceppi che condividono 6 o 7 alleli sui 7 loci della MLST con almeno un altro ST nel gruppo [Smith, Feil and Smith, 2000; Feil et al., 2004]. Si presume che i CCs emergano da un genotipo singolo e altamente adattato "*founding ST*" (posto alla base del cono) e successivamente raggiunge una frequenza osservabile all'interno della popolazione e persiste per decenni. Si pensa che l'evoluzione e la disseminazione di questi cloni altamente adattati riduce la diversità determinando la dominanza di STs strettamente correlati all'interno di un clonal complex (rappresentato dal cerchio in cima al cono). Feil et al. hanno descritto un algoritmo chiamato *eBURST* che può essere utilizzato per analizzare i dati MLST e predire sia il *founding ST* e gli STs strettamente correlati all'interno di un clonal complex [Feil et al., 2004].

Grazie ai vantaggi derivanti dalle analisi genomiche più recenti, altri tipi di geni sono stati aggiunti ai tradizionali geni *housekeeping* per creare quello che viene definito come "*MLST+ strategies*". Alcuni autori hanno incluso i geni di virulenza [den Bakker et al., 2010] e altri hanno incluso i geni 16S rRNA [Kotetishvili et al., 2002]. Altri ancora hanno utilizzato i soli geni di virulenza per la subtipizzazione di alcuni patogeni come *Listeria*

monocytogenes [Vines and Swaminathan, 1998; Zhang et al., 2004], *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti [Gomes et al., 2005; Verghese et al., 2012] e *Clostridium difficile* [Lemée et al., 2005]. Zhang, Jayarao e Knabel (2004) hanno rinominato la MLST che utilizza i soli geni di virulenza come *Multi-Virulence-Locus Sequence Typing* o MVLST.

L'abilità dei geni di virulenza di identificare accuratamente e differenziare i cloni epidemici dei vari batteri patogeni [Chen et al., 2007; Lomonaco et al., 2008; Liu et al., 2011; Knabel et al., 2012; Verghese et al., 2012] può essere riconducibile al fatto che i geni di virulenza possono essere pleiotropici, incrementando sia la trasmissione che l'abilità di causare malattie invasive [Smith, Fail and Smith, 2000]. Sebbene le sequenze dei geni di virulenza sono state utilizzate per identificare e differenziare i cloni epidemici, non riescono a differenziare *clusters* di *outbreak* all'interno dello stesso clone epidemico, ossia per ogni EC corrisponde un unico Virulence Type (VT) [Chen et al., 2007; Lomonaco et al., 2008; Liu et al., 2011; Knabel et al., 2012; Verghese et al., 2012]. Per studi di approfondimento all'interno di un EC è possibile utilizzare altre strategie di subtipizzazione, le quali analizzano isole genomiche che evolvono più rapidamente a causa della ricombinazione e del trasferimento orizzontale dei geni [Juhas et al., 2007; Asadulghani et al., 2009; Verghese et al., 2011]. Esempi sono la *Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPRs) per *Salmonella* [Liu et al., 2011; Fabre et al., 2012] e *comK prophage junction fragments* in *L. monocytogenes* [Chen and Knabel, 2008; Verghese et al., 2011].

È indispensabile che i metodi di tipizzazione epidemiologica siano basati su markers molecolari epidemiologicamente rilevanti e che la velocità dei cambiamenti genetici ai quali i markers sono sottoposti sia adatta allo scopo dello studio [Foxman et al., 2005; Chen and Knabel, 2008]. Due dei più importanti criteri in epidemiologia molecolare sono il potere discriminante e la concordanza epidemiologica [Struelens, 1996; van Belkum et al., 2007].

Il potere discriminante è la capacità di un metodo di tipizzazione di discriminare due ceppi non correlati tra loro e campionati in modo random dalla popolazione di una data specie [Struelens, 1996; van Belkum et al., 2007]. Un potere discriminante troppo elevato può essere un problema se un metodo di subtipizzazione molecolare discrimina tra i ceppi che fanno parte dello stesso *outbreak*. Alcuni di questi problemi sono noti in alcune metodiche come ad esempio la PFGE [Graves et al., 2005; Olsen et al., 2005; Knabel et al., 2012].

La concordanza epidemiologica è la probabilità che ceppi epidemiologicamente correlati siano abbastanza simili attraverso l'epidemiologia molecolare da essere classificati all'interno dello stesso clone (Struelens, 1996). In altre parole, al fine di essere certi nelle nostre conclusioni riguardo la causa di una epidemia o un *outbreak*, risulta indispensabile che i dati derivanti dall'epidemiologia convenzionale e quelli della epidemiologia molecolare siano concordi tra loro, in modo da avere una elevata concordanza epidemiologica. Al fine di massimizzare la concordanza epidemiologica è necessario selezionare i geni specifici (*markers*) che sono responsabili di eventi epidemici e quindi che posseggano una rilevanza epidemiologica. È importante evidenziare che molti geni (*markers*) all'interno del genoma potrebbero non possedere una rilevanza epidemiologica e quindi possono confondere la "vera" epidemiologia. Per esempio, i geni housekeeping sono critici per il metabolismo basale e sono soggetti ad una evoluzione selettiva neutra. Per queste ragioni, non si ci aspetta che giochino il ruolo principale nell'adattamento selettivo e nell'evoluzione dei cloni epidemici, e quindi anche il possesso di una rilevanza epidemiologica [Oyarzabal O.A. and Kathariou S, 2014]. La ragione per cui le sequenze dei geni housekeeping sono spesso correlate con i cloni epidemici è probabilmente dovuta al fatto che specifici STs transitano "*hitchhike*" insieme ai cloni epidemici altamente adattati ed emergenti [Smith, 1993] e successivamente divergono nel tempo, determinando CCs contenenti numerosi STs.

Recenti ricerche hanno rivelato che i CCs non sempre corrispondono ai cloni epidemici (EC), qualche volta due differenti CCs fanno parte dello stesso EC e qualche volta STs e VTs all'interno di un clonal complex non fanno parte di uno stesso EC [Oyarzabal O.A. and Kathariou S, 2014]. La ragione potrebbe essere che i CCs rappresentano gruppi più antichi rispetto agli ECs [Cantinelli et al., 2013]. È importante ricordare che è l'EC che si trasmette ampiamente nel tempo e nello spazio e non il CC contenente differenti STs. A differenza dei STs, i VTs identificano e differenziano molto accuratamente cloni epidemici di vari patogeni [Chen et al., 2007; Liu et al., 2011; Verghese et al., 2012]. Per cui, a differenza del Modello per la struttura epidemica della popolazione di Smith basato sui STs e CCs, viene proposto un secondo modello evolutivo modificato definito come Modello evolutivo dei cloni epidemici, in cui il clone epidemico altamente adattato che emerge e si diffonde è un VT che non cambia la propria sequenza nell'arco dei decenni, principalmente dovuto ad una forte pressione selettiva negativa. Smith et al. hanno concluso che in assenza di un vantaggio selettivo, è difficile spiegare come i cloni epidemici possano emergere e persistere oltre un decennio prima di essere suddivisi da

una ricombinazione (Smith et al., 2000). Questo può spiegare perché i geni di virulenza all'interno dei cloni epidemici mantengono l'identità di sequenza per un lungo periodo di tempo. Per definizione un *Epidemic Clone* (EC) è un ceppo batterico discendente da una cellula ancestrale comune e che è stato coinvolto in diversi *outbreaks* separati nel tempo e nello spazio, mentre l'*Outbreak Clone* (OC) è un ceppo batterico che ha causato un *outbreak*.

2. SCOPO

L'indagine sulla listeriosi invasiva in Regione Lombardia, oggetto del presente lavoro di tesi, è stata svolta presso il Laboratorio enterobatteri del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli Studi di Milano.

In Lombardia l'attività di sorveglianza della listeriosi si basa su due approcci, uno passivo che fa riferimento al sistema MAINF per la notifica delle malattie infettive, e uno attivo, basato sulla rete dei laboratori che effettuano la diagnosi. Questi ultimi fanno capo al laboratorio enterobatteri (LAB) che provvede alla tipizzazione microbiologica degli isolati di *L. monocytogenes*.

La tesi si pone due obiettivi:

1. in primo luogo vuole fornire conoscenze più approfondite riguardo all'epidemiologia della listeriosi in Lombardia, valutando la sensibilità della sorveglianza e quindi il grado di sottostima attraverso l'elaborazione dei dati forniti dalle due diverse fonti informative (notifiche-MAINF e Rete di laboratorio), così da calcolare l'incidenza di malattia sui casi complessivamente osservati nel periodo 2006-2014, anche in funzione della distribuzione per provincia.
2. il secondo obiettivo consiste nella caratterizzazione degli isolati di *Lm*, raccolti dal sistema basato sulla Rete di Laboratorio, attraverso l'applicazione di tecniche microbiologiche di tipizzazione su base fenotipica (sierotipizzazione) e biomolecolari su base genotipica (PFGE, MLST e MVLST), al fine di individuare i "tipi" prevalenti ed evidenziare eventuali cluster epidemici così da poter contribuire al riconoscimento della catena di contagio e del veicolo d'infezione.

3- MATERIALI E METODI

3.1 Studio epidemiologico

3.1.1 Fonti informative e raccolta dati

Nello studio sono stati inclusi:

- tutti i casi di infezione rilevati dal sistema di notifiche della regione Lombardia;
- tutti gli isolamenti di laboratorio registrati dal laboratorio enterobatteri (LabSS) del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli Studi di Milano.

3.1.2 Sistema di notifiche in Regione Lombardia

In base al D.M. 15/12/1990 (sistema informativo sulle malattie infettive e diffusive) pubblicato sulla G.U. n° 6 dell'8/01/91, la listeriosi è una malattia soggetta a notifica obbligatoria di classe seconda [D.M. 15/12/1990]. Un caso di listeriosi è definito sulla base di un quadro clinico compatibile correlato all'isolamento di *Lm* da un sito normalmente sterile.

In Lombardia i dati completi relativi alla notifica dei casi di listeriosi per gli anni 2006-2014 sono stati ottenuti consultando il database attivato nel 2005 per la gestione delle malattie infettive (MAINF) che prevede l'inserimento, da parte delle diverse ASL della Regione, dei dati relativi ai casi segnalati dai medici di base o dalle Direzioni Sanitarie e di tutti i relativi aggiornamenti (risultati degli esami diagnostici, schede di profilassi, dati di contagio, ecc.) [MAINF, www.mainf.regione.lombardia.it].

L'accesso alle pratiche relative ai casi (Allegato 1) di listeriosi comporta in primo luogo l'esportazione delle pratiche di interesse utilizzando due filtri: patologia d'interesse e anno in cui è avvenuta la validazione del caso. Si ottiene quindi un elenco di tutte le pratiche dei casi di listeriosi per anno, ciascuna delle quali contrassegnata da un codice identificativo, che viene quindi utilizzato per la consultazione della pratica in questione.

3.1.3 Sorveglianza di laboratorio

La seconda fonte di informazioni è rappresentata dai dati raccolti attraverso un sistema di sorveglianza di laboratorio, avviato nel 2005 per iniziativa congiunta della Regione Lombardia e del Centro Enterobatteri (LabSS). Un caso di listeriosi è identificato

dall'isolamento di *Lm* da un sito normalmente sterile. Grazie alla collaborazione dei laboratori ospedalieri lombardi, questo sistema di sorveglianza raccoglie attivamente gli stipiti di *Lm* isolati dai casi clinici e le relative informazioni di carattere clinico-epidemiologico riportate su una scheda informativa apposita, concordata con l'Istituto Superiore di Sanità [Sistema di Sorveglianza delle Malattie invasive batteriche coordinato dal Dipartimento delle Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate]. I ceppi e le schede di raccolta dati per i casi di Listeriosi (Allegato 2) sono inviati al Laboratorio enterobatteri (LabSS).

3.1.4 Elaborazione dati

Tutti i casi rilevati dalle due fonti informative sono stati incrociati utilizzando come variabile di *linkage* il nome e il cognome, o le iniziali del paziente e la sua data di nascita. In questo modo è stato possibile realizzare, utilizzando il sistema Microsoft Office Excel 2007, una banca dati relativi ai casi totali osservati nel periodo 2006-2014, comprendenti i casi segnalati solo dal sistema di notifiche lombardo, i casi rilevati solo dal Laboratorio enterobatteri e i casi segnalati da entrambi i sistemi di sorveglianza.

Per ogni paziente sono state raccolte le informazioni relative a:

- sesso/età;
- nazionalità;
- provincia, utilizzando la provincia del comune di domicilio, oppure, nel caso quest'ultima non fosse disponibile, facendo riferimento alla provincia del comune di residenza. Per i casi dal 2006 al 2009, essendo stata istituita nel 2009 la provincia di Monza- Brianza (MB), è stata effettuata una correzione della provincia di domicilio/residenza in base al comune di residenza in modo da distinguere i casi della provincia di MB da quelli della provincia di MI;
- mese/anno di ricovero, nel caso in cui la data di ricovero non fosse stata segnalata è stata utilizzata la data del prelievo. I casi di MAINF che riportavano una data non compatibile con l'anno in cui erano stati archiviati sono stati riassegnati in base all'anno riportato alla voce "data di ricovero". La data di inizio sintomi, anche se riportata sulla scheda di notifica, non è stata presa in considerazione perché, sebbene sia quella che più vicina al momento del contagio, risulta essere un dato inaffidabile;

- sindrome clinica, distinguendo i casi connessi e non connessi alla gravidanza. I casi connessi alla gravidanza sono rappresentati da donne in gravidanza affette da listeriosi e/o neonati che manifestano listeriosi entro i 28 giorni di vita; i casi coinvolgenti sia la madre che il neonato sono stati considerati come un unico caso. È stato possibile riconoscere tali casi in base al nominativo, alla data, all'ospedale di ricovero e alla provincia di residenza;
- fattori di rischio preesistenti;
- evoluzione;
- matrice da cui è stato isolato il batterio.

Sono stati esclusi dal database tutti i soggetti non residenti in Lombardia e sono stati conteggiati una sola volta i casi che sono stati segnalati più volte a ciascuna delle due fonti informative.

3.2 Caratterizzazione microbiologica di *L. monocytogenes*

Sono stati sottoposti alla caratterizzazione feno-genotipica tutti gli stipti di *Lm* inviati al LabSS nel periodo 2006-2014 dai laboratori ospedalieri aderenti alla rete di sorveglianza.

3.2.1 Caratterizzazione fenotipica

Tutti i ceppi di *Lm* sono stati sierotipizzati e suddivisi in quattro distinti gruppi molecolari utilizzando la Multiplex-PCR attraverso la collaborazione del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare - Istituto Superiore di Sanità di Roma. Il sierotipo è stato identificato attraverso l'uso di specifici antisieri all'interno del relativo sierogruppo. 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 termolabile; l'antigene O somatico fa parte della porzione di natura polisaccaridica della parete cellulare del batterio ed è invece termostabile. 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 indicata dal produttore degli antisieri (Biogenetics s.r.l.),

mentre per la determinazione degli antigeni flagellari si utilizza una metodica in micrometodo messa a punto da [Ueda F. et al., 2002].

3.2.2 Caratterizzazione genotipica

Multi-Locus Sequence Typing

La *Multi-Locus Sequencing Typing* (MLST) è stata eseguita su tutti gli isolati di *Lm* in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico della Puglia e Basilica, come riportato in letteratura (Feil EJ and Enright MC, 2004; Ragon M et al., 2008; Salcedo C. et al., 2003). Le cellule batteriche sono state lisate mediante sonicazione (10 min) e successivamente centrifugate per 5 min. Mediante l'utilizzo della PCR, i geni d'interesse vengono amplificati e successivamente sequenziati entrambi i filamenti (circa 450-500 bp) usando un sequenziatore di DNA automatizzato. I 7 geni housekeeping presi in esame sono riportati nella tabella: ABC transporter (*abcZ*), beta-glucosidase (*bglA*), catalase (*cat*), succinyl diaminopimelate desuccinylase (*dapE*), damino acid aminotransferase (*dat*), l-lactate dehydrogenase (*ldh*), histidine kinase (*lhkA*). L'amplificazione dei geni d'interesse è stata eseguita utilizzando i primer riportati in tabella 4. Le condizioni di PCR sono state: 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 al "*Listeria MLST database*" presso il *Pasteur Institute, France* (www.pasteur.fr/mlst). L'MLST si basa sull'analisi della sequenza di basi del DNA dei geni housekeeping attraverso il software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) e caratterizza i ceppi in base ai loro profili allelici.

Tabella 4. 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>	abcZ -Up, TCGCTGCTGCCACTTTTATCCA	abcZ -Dn, TCAAGGTCGCCGTTTAGAG
<i>bglA</i>	bglA -Up, GCCGACTTTTTATGGGGTGGAG	bglA -Dn, CGATTAAATACGGTGCGGACATA
<i>cat</i>	cat -Up, ATTGGCGCATTTTGATAGAGA	cat -Dn, AGATTGACGATTCCTGCTTTTG
<i>dapE</i>	dapE -Up, CGACTAATGGGCATGAAGAACAAG	dapE -Dn, ATCGAACTATGGGCATTTTTACC
<i>dat</i>	dat -Up, GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA	dat -Dn, TCGTCCATAATACACCATCTTT
<i>ldh</i>	ldh -Up, ATTTTGATCGTATTGGGGTTTT	ldh -Dn, TACTGAATGGATTAGCGAAGATGA
<i>lhkA</i>	lhkA -Up, AGAATGCCAACGACGAAACC	lhkA -Dn, TGGGAAACATCAGCAATAAAC

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Per tutti gli isolati pervenuti al LabSS è stata effettuata, così come previsto dal sistema di sorveglianza ufficiale e in accordo con la Rete TESSy e l'ECDC, l'analisi molecolare *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. La PFGE è stata eseguita seguendo il protocollo PulseNet [Standard operating procedure for PulseNet of *Listeria monocytogenes*, www.cdc.gov]. Questa tecnica permette di analizzare tutto il genoma del cromosoma batterico attraverso restrizione enzimatica; grazie all'applicazione di un campo elettrico la cui direzione varia periodicamente di un angolo di 120°, consente una ottimale separazione dei frammenti in funzione del loro peso molecolare (espresso in Kb). Il ceppo standard di riferimento utilizzato come marcatore di peso molecolare è stato una *Salmonella* ser. Braenderup H9812(Figura9).

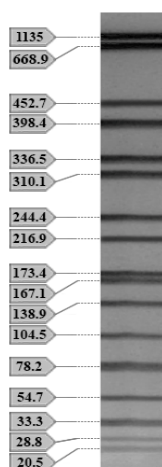


Figura 9: Profilo elettroforetico di *Salmonella* ser. Braenderup H9812e pesi molecolari delle bande di restrizione.

Tutti i ceppi batterici batteri sono stati piastrati e isolati su piastre di terreno *Brain Heart Infusion Agar* (Oxoid, limited, Basingstoke, UK) e posti in incubazione a 37°C per 14-18 ore. È stata quindi prelevata la patina batterica con un tampone sterile ed è stata sospesa in 2 mL di TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) Buffer. Questo processo è ripetuto per ogni campione da analizzare. Segue l'incorporazione dei batteri in agarosio. Vengono trasferiti 400 µL di sospensione cellulare in eppendorf da 1,5 mL a cui sono aggiunti 20 µL di soluzione di lisozima 20 mg/mL (*Sigma Aldrich, Canada*). Le eppendorf contenenti la sospensione cellulare e il lisozima vengono poste in un bagnetto riscaldato a 55-60°C per 10-20 minuti. Terminata la fase di predigestione da parte del lisozima, vengono aggiunti alla sospensione 20 µL di soluzione di Proteinasi K 20 mg/mL (*Roche Diagnostics, Indianapolis, USA*). Contemporaneamente si prepara un gel di agarosio (*SeaKem Gold Agarose, Lonza, Rockland, USA*) fuso all'1% in TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) e se ne aggiungono 400 µL alla soluzione precedentemente preparata.

Una volta terminato questo passaggio si dispensa rapidamente la miscela di agarosio nelle appropriate celle del plug mold, uno stampo utilizzato per far solidificare la soluzione di agarosio in cubetti (plug). Ogni blocco di agarosio solidificato viene posto in una soluzione contenente 5 mL di Buffer di lisi (50mM Tris, 50 mM EDTA, Ph 8 + 1% Sarcosyl) e 25 µL di proteinasi K 20 mg/mL e lasciato incubare per due ore in un bagnetto agitato a 150-175 rpm e riscaldato a 54-55°C.

I blocchetti di agarosio vengono lavati due volte con acqua pura ultrasterile e quattro volte con il TE Buffer. A ogni lavaggio si sospendono i plug in 10 mL di acqua pura ultrasterile o TE buffer precedentemente riscaldati a 54-55°C per poi incubarli per 10-15 minuti in un bagnetto riscaldato a 54-55°C e agitato a 175 rpm. I blocchetti possono essere conservati per molti mesi a 4°C.

Successivamente si procede con la restrizione del DNA sia dei campioni di *Lm* sia dello standard *Salmonella* ser. Braenderup H9812. Gli enzimi utilizzati per *Lm* sono *Ascl* e *Apal* (Fig 10). Per la *Salmonella* ser. Braenderup H9812 invece viene utilizzato *XbaI* (*New England, BioLabs*).

Prima di procedere con la restrizione vera e propria è caldamente raccomandato dal protocollo una fase di prerestrizione. I plug vengono tagliati in pezzetti da 2 mm e posti in una soluzione così composta: 180 µL di acqua ultrasterile e 20 µL del Buffer di restrizione 10X (*New England, BioLabs*). I frammenti vengono quindi incubati per 5-10 minuti in un bagnetto riscaldato:

- a 37°C se il campione deve essere digerito con *Ascl* o *Xbal*;
- a 30°C se il campione deve essere digerito con *Apal*.

Al termine della prerestrizione i plug vengono trasferiti in una soluzione contenente 175 µL di acqua ultrasterile, 20 µL di Buffer di restrizione 10X, 2 µL di BSA (Bovine Serum Albumin), 3 µL di enzima 10 U/µL. Gli enzimi utilizzati sono stati: *Ascl* 10 U/mL (*New England, BioLabs*); *Xbal* 20 U/mL, (*New England, BioLabs*); *Apal* 40 U/µL (*Roche Diagnostics, Indianapolis, USA*). Si procede quindi all'incubazione dei plug per 2 ore in un bagnetto riscaldato alla temperatura appropriata per l'enzima utilizzato:

- 25°C per *Apal*;
- 37°C per *Ascl* e *Xbal*.



Figura 10: sito di restrizione *Ascl* e *Apal*

Si procede quindi alla preparazione di 2200 mL di tampone di corsa 0,5X Tris-Borato EDTA Buffer (*Sigma Aldrich, USA*) necessari sia per il gel che per la corsa elettroforetica.

Viene quindi preparato dell'agarosio all'1% in 100 mL di soluzione TBE (tris-borate EDTA buffer) 0,5X. Una volta solidificato il gel per la corsa elettroforetica si caricano i plugs dei ceppi di *L. m.* nei pozzetti inserendo 3 plug *Salmonella Ser. Breanderoup*.

L'apparecchio utilizzato per la corsa elettroforetica è il Contour-clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) (*BioRad*). Le condizioni di corsa sono state le seguenti:

- Initial switch time: 4 s;
- Final switch time: 40 s;
- Voltage: 6 V;
- Included Angle: 120°;
- Run time: 18-19 hours;

Nel campo di migrazione gli elettrodi sono posti ad esagono in modo da generare un campo elettrico con angolatura di 120° in tutte le aree del gel.

Per visualizzare le bande della corsa elettroforetica, si colora il gel immergendolo per 20-30 minuti in 400 mL acqua pura ultrasterile contenenti 4 µL di bromuro di etidio (10

mg/mL) (*Sigma Aldrich, Canada*). Per eliminare il rumore di fondo si prosegue con tre lavaggi da 20 minuti l'uno con acqua ultrasterile, quindi si effettua la visualizzazione e registrazione del profilo di bande con un transilluminatore UV.

L'immagine del gel viene fotografata ed analizzata con il software InfoQuest (*BioRad*) in grado di analizzare i profili di restrizione mediante il calcolo dei coefficienti di omologia rilevando quindi eventuali correlazioni e omologie tra i diversi ceppi.

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.

Multi-Virulence Locus Sequence Typing

La *Multi-Virulence-Locus Sequence Typing* (MVLST) è stata eseguita come riportato in letteratura (Yi Chen et al., 2007; Knabel et al., 2012) attraverso la metodica sviluppata per *Lm* dal Dr. Wei Zhang (*Institute for Food Safety and Health, Illinois Institute of Technology*) nel laboratorio del Dr. Stephen J. Knabel (*Department of Food Science, The Pennsylvania State University*). Tutti gli isolati ritenuti di maggiore interesse epidemiologico secondo la MLST sono stati caratterizzati successivamente attraverso MVLST, nel corso di un programma di *Exchange Research Scholar* presso il *Department of Food Science, The Pennsylvania State University*.

Le cellule batteriche sono state lisate mediante sonicazione (10 min) e successivamente centrifugate per 5 min a 3000 rpm. I geni d'interesse sono stati amplificati mediante PCR in reazioni di volume 25µl ad una concentrazione finale di 0,2 µM utilizzando la *Taq PCR Master Mix Kit* (*Qiagen Inc., Valencia, CA*), e successivamente entrambi i filamenti (circa 500 bp) sono stati sequenziati usando un sequenziatore di DNA automatizzato. I 6 geni di virulenza presi in esame sono: Clp protease proteolytic subunit (*clpP*), Alanine racemase (*dal*), Internalin B (*inIB*), Internaline C (*inIC*), two-component response regulator (*lisR*), Listeriolysin positive regulatory protein (*prfA*). L'amplificazione dei geni d'interesse è stata eseguita utilizzando i primer riportati in tabella 5.

Le condizioni di PCR sono state: denaturazione iniziale a 95°C per 30 sec seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 30 s, riappaiamento dei filamenti a 55°C per 30 s ed amplificazione a 72°C per 1 min seguita da uno step finale di 72°C per 7 min. I frammenti di DNA sono purificati usando il kit di purificazione ExoSAP-IT (*Affymetrix USB*) e sono sequenziati in entrambe le direzioni con Big Dye fluorescent terminators (*PE Applied Biosystems*) sul sequenziatore automatizzato. Gli alleli e il *Virulence Type* (VT) sono

assegnati sottomettendo le sequenze di DNA al “*Listeria MVLST database*” attraverso il portale web ufficiale (<https://sites.google.com/site/mvlstdatabase/home>). La MVLST analizza la sequenza di basi del DNA dei geni di virulenza attraverso il software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) e caratterizza i ceppi in base ai loro profili allelici.

Tabella 5. Primers utilizzati per l'ampificazione PCR e il sequenziamento dei geni di virulenza di *Listeria monocytogenes*

Gene	Primer and sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>clpP</i>	clpP -Up, CCAACAGTAATTGAACAAACTAGCC	clpP -Dn, GATCTGTATCGCGAGCAATG
<i>dal</i>	dal -Up, GGTTTCTGCGTAGCCATTTT	dal -Dn, GGAAGGGGTCAATCCATACA
<i>inlB</i>	inlB -Up, CATGGGAGAGTAACCCAACC	inlB -Dn, GCGGTAACCCCTTTGTCATA
<i>inlC</i>	inlC -Up, CGGGAATGCAATTTTTCACTA	inlC -Dn, AACCATCTACATAACTCCCACCA
<i>lisR</i>	lisR -Up, CGGGGTAGAAGTTTGTGTCGTC	lisR -Dn, ACGCATCACATACCCTGTCC
<i>prfA</i>	prfA -Up, AACGGGATAAAACCAAAACCA	PrfA -Dn, TGCGATGCCACTTGAATATC

3.3 Analisi delle correlazioni spazio temporali tra i casi

Per individuare possibili focolai epidemici abbiamo analizzato la distribuzione spazio temporale dei casi analizzati in Regione Lombardia negli anni 2006-2014, considerando al tempo stesso anche il livello di omologia dei rispettivi ceppi. I dati relativi alla localizzazione geografica e temporale dei casi sono stati ricavati dalle schede di raccolta dati, e riguardano la provincia di residenza e la data di ricovero del paziente.

3.3.1 Inchieste epidemiologiche

In seguito alle evidenze derivanti dalle analisi molecolari (ST, omologia PFGE > 90% e VT) e dalla distribuzione spazio-temporale, ci siamo attivati nel recupero delle indagini epidemiologiche dei casi in cui si può supporre una vera epidemia a fonte comune. Le indagini epidemiologiche sono state condotte dalle rispettive ASL attraverso una richiesta ufficiale da parte della Direzione Generale Salute della Regione Lombardia.

3.3.2 Analisi statistica

Dove possibile è stato applicato il test del chi-quadrato o il test esatto di Fisher per valutare le associazioni tra le variabili, espresse in percentuali o numeri. La differenza è stata considerata significativa con $P < 0.05$.

3.4 Modelli applicati in epidemiologia molecolare

I dati MLST ottenuti dalla caratterizzazione degli isolati oggetto dello studio sono stati analizzati secondo un modello per la struttura epidemica della popolazione [Smith, Feil and Smith, 2000]. Il modello consiste in una popolazione di sfondo composta da un grande numero di genotipi rari e non correlati, i quali sono ricombinanti ad alta frequenza. Questo sfondo è sovrastrato da un limitato numero di genotipi molto frequenti, o clusters di genotipi correlati denominati Clonal Complexes (CC) (Figura 11).

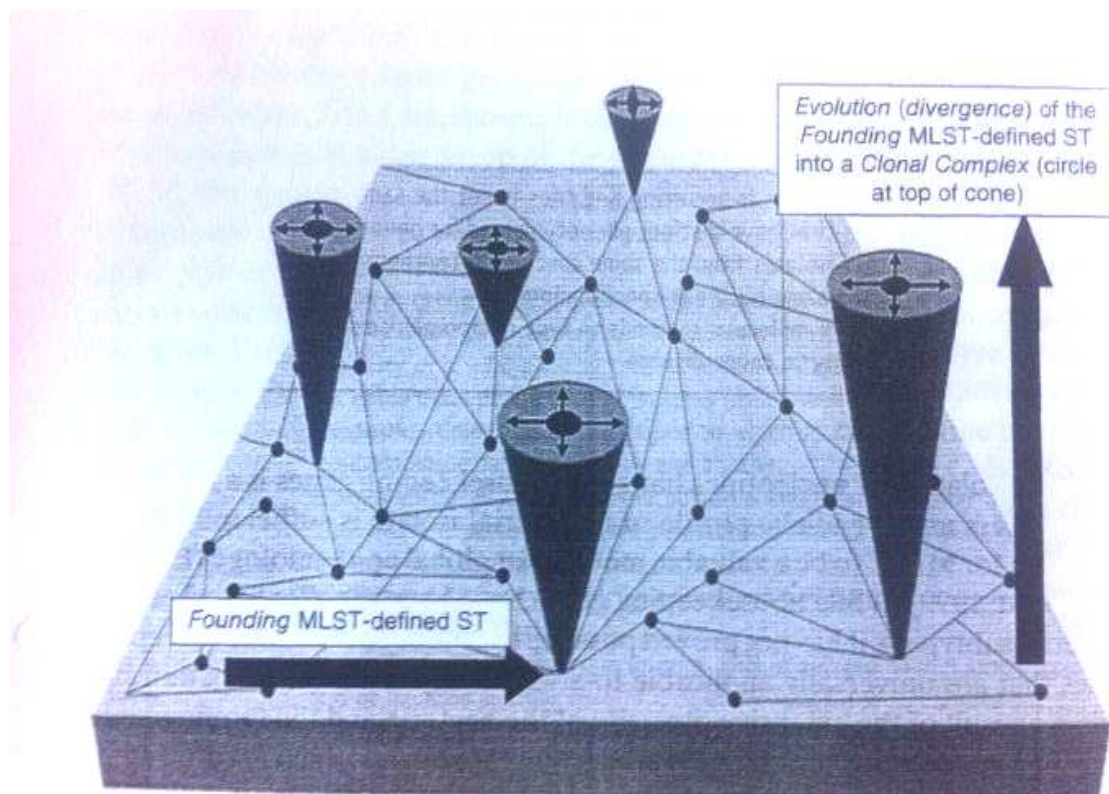


Figura11: Modello per la struttura epidemica della popolazione [Smith, Feil and Smith, 2000; Oyarzabal O.A. and Kathariou S, 2014]

I dati MVLST ottenuti per gli isolati lombardi, ritenuti di maggiore interesse sono stati analizzati secondo il “Modello evolutivo dei cloni epidemici” (Figura 12). A differenza del modello precedente basato sui STs e CCs, nel modello evolutivo basato sulla MVLST è il clone epidemico altamente adattato che emerge e si diffonde.

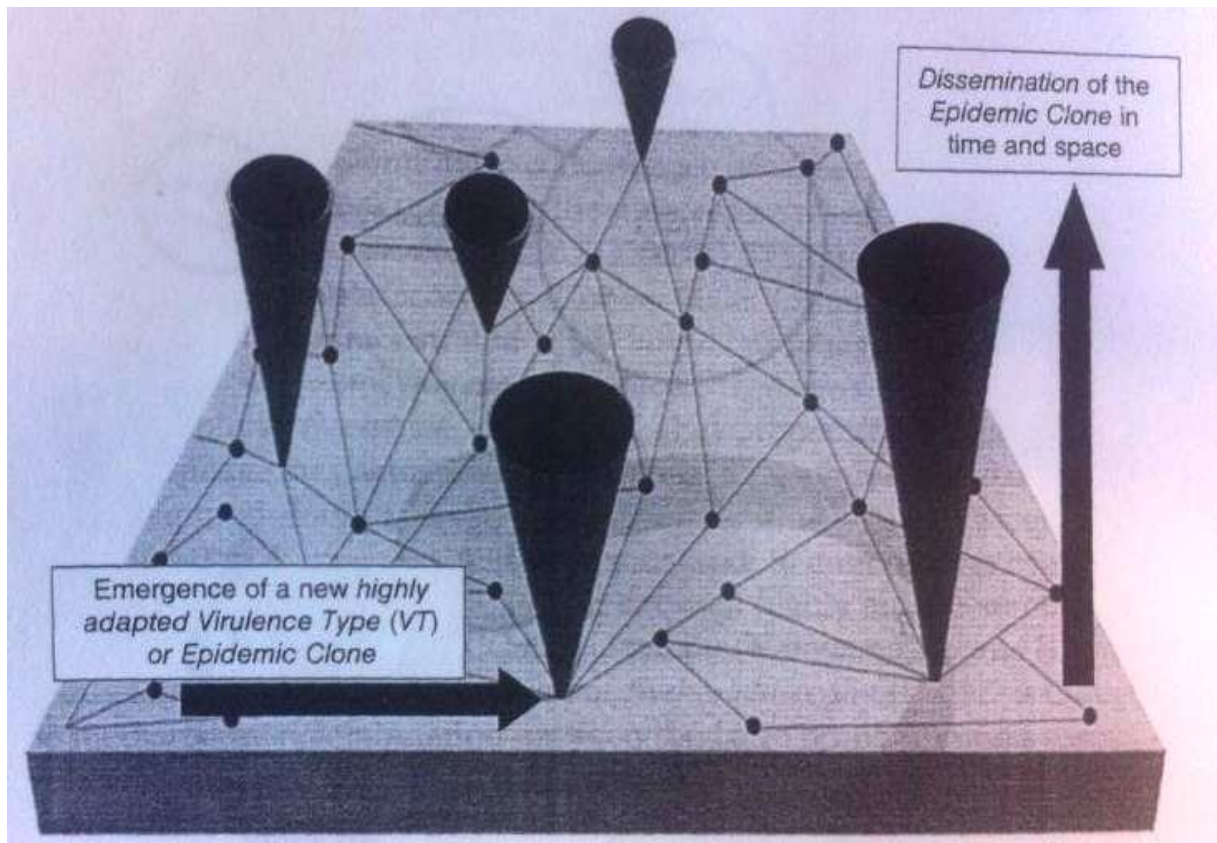


Figura 12: Modello evolutivo dei cloni epidemici [modified from Smith, Feil and Smith, 2000; Oyarzabal O.A. and Kathariou S, 2014]

4 RISULTATI

4.1 Listeriosi in Lombardia: epidemiologia descrittiva

In Lombardia l'incrocio dei due database ha permesso di rilevare (Tabella 6) un totale di 580 casi, La grande maggioranza (541) è risultata non associata alla gravidanza, mentre solo 39 casi (6,7%) sono riconosciuti come casi *pregnancy-related*.

Sul totale dei casi osservati il 5,02% è stato segnalato solo dal sistema MAINF, il 16,7% casi solo dalla sorveglianza di laboratorio e il 33,1% casi da entrambi i sistemi di sorveglianza. In media ogni anno i casi catturati da entrambe le fonti sono stati 21 e quelli rilevati solo da una fonte 43, di cui 32 rilevati solo da MAINF e 11 rilevati solo da LabSS. Il massimo livello di sovrapposizione tra i due database (52,8%) è stato registrato nel 2014 (Figura 11). In totale sono stati notificati 483 casi di listeriosi attraverso il sistema di sorveglianza MAINF, con un andamento in crescita dal 2006 (n = 35) al 2014 (n = 56). Nello stesso periodo e con un *trend* analogo i casi riportati dalla sorveglianza di laboratorio (LabSS) sono stati 289, (Figura 13).

L'incremento del numero di casi tra il 2006 e il 2014 risulta essere più spiccato per la sorveglianza di laboratorio (+ 386%), rispetto al sistema MAINF (+ 160%). Nonostante l'andamento in crescita risulti maggiore per il LabSS, il numero di casi rilevati è sempre stato inferiore rispetto al numero di casi riportati da MAINF. I casi rilevati dal sistema di sorveglianza MAINF sono risultati ogni anno più prossimi ai casi totali osservati rispetto a quanto non lo fossero i casi rilevati dal sistema LabSS, ad eccezione del 2014 in cui i casi rilevati da entrambe le fonti sono equiparabili (Figura 13).

L'incrocio dei due database ha permesso di rilevare (Tabella 6) un totale di 580 nominativi, i quali erano per il 50,2% casi segnalati solo dal sistema MAINF, per il 16,7% casi rilevati solo dalla sorveglianza di laboratorio e per il 33,1% casi presenti in entrambi i database. In media ogni anno i nominativi coincidenti sono stati 21 e quelli non coincidenti 43, di cui 32 rilevati solo da MAINF e 11 rilevati da LabSS. Il massimo livello di sovrapposizione tra i due database (52,8%) è stato registrato nel 2014 (Figura 13).

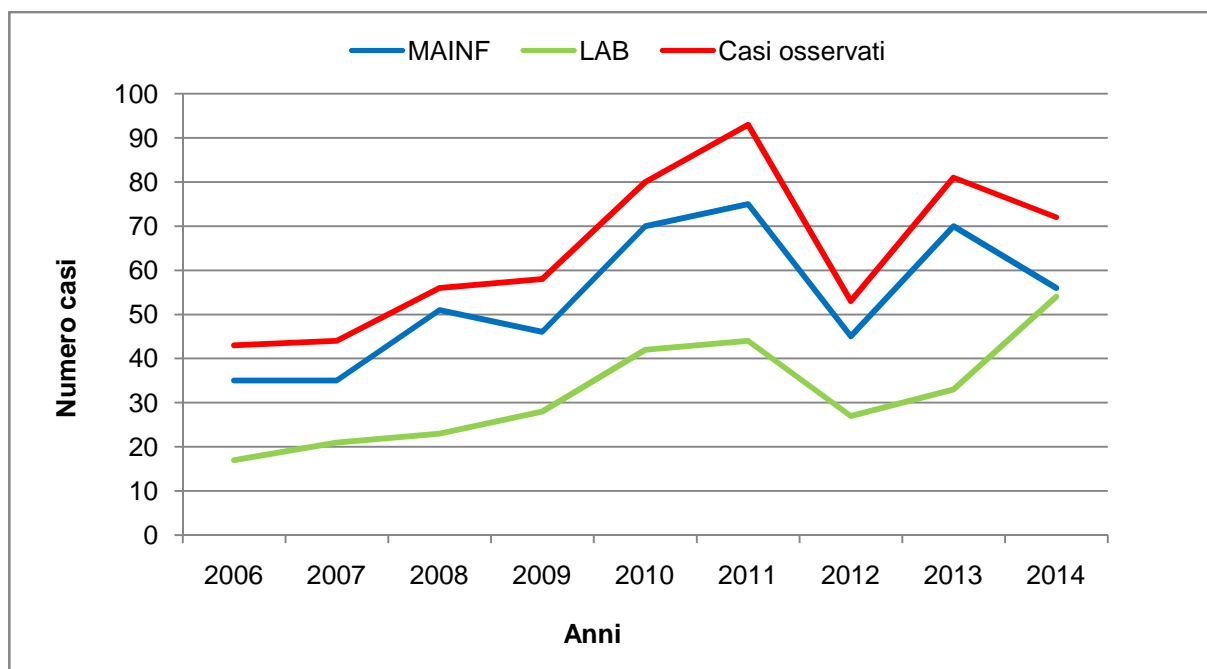


Figura 13: Confronto dell'andamento dei casi di listeriosi notificati da MAINF (notifiche), dei casi rilevati dal LAB (Schede dati) e dei casi totali osservati (casi osservati).

Tabella 6. Casi di isteriosi e incidenza in Lombardia nel periodo 2006-2014

Anni	Popolazione	Solo MAINF (%)	Solo LAB (%)	Sia MAINF che LAB (%)	Totali casi osservati	Incidenza x10 ⁵
2006	9.341.231	26 (60,5)	8 (18,6)	9 (20,9)	43	0,46
2007	9.393.968	23 (52,3)	9 (20,4)	12 (27,3)	44	0,47
2008	9.469.841	33 (58,9)	5 (8,9)	18 (32,2)	56	0,59
2009	9.545.515	30 (51,7)	12 (20,7)	16 (27,6)	58	0,61
2010	9.600.951	38 (47,5)	10 (12,5)	32 (40,0)	80	0,83
2011	9.663.872	49 (52,7)	18 (19,3)	26 (28,0)	93	0,96
2012	9.700.881	26 (49,1)	8 (15,1)	19 (35,8)	53	0,55
2013	9.794.525	48 (59,3)	11 (13,5)	22 (27,2)	81	0,83
2014	9.973.397	18 (25,0)	16 (22,2)	38 (52,8)	72	0,72
Totale	86.484.181	291 (50,2)	97 (16,7)	192 (33,1)	580	0,67

In generale, la percentuale dei casi rilevati solamente dalla sorveglianza di laboratorio varia per anno e provincia, dal 9% nel 2008 al 22% nel 2014 e dal 0% nella provincia di Mantova al 43% nella provincia di Lodi (Tabella 7). L'incidenza della listeriosi varia da 0,46 per 100.000 abitanti nel 2006 a 0,96 per 100.000 abitanti nel 2011; da 0,22 per 100.000 abitanti nella provincia di Mantova a 1,11 per 100.000 abitanti nella provincia di Sondrio. L'incidenza media in Regione Lombardia è di 0,67 per 100.000 abitanti. Analizzando i tassi di incidenza provinciale (Tabella 7) e comparandoli con la media annuale lombarda, si osserva come le province il cui tasso di incidenza annuale si assesta sopra il tasso di incidenza regionale (0,67 x 100.000 abitanti) sono: Bergamo, Cremona, Lecco, Lodi, Milano e Sondrio. Le province il cui tasso di incidenza medio annuale è inferiore rispetto al tasso medio regionale sono: Brescia, Como, Monza-Brianza, Mantova, Pavia e Varese.

Tabella 7. Casi di listeriosi e incidenza per provincia nel periodo 2006-2014

Province	Popolazione	Solo MAINF (%)	Solo LAB (%)	Sia MAINF che LAB (%)	Totali casi osservati	Incidenza x10 ⁵
BG	1.067.301	43 (43,9)	9 (9,2)	46 (46,9)	98	1,02
BS	1.218.826	25 (43,9)	17 (29,8)	15 (26,3)	57	0,52
CO	580.510	12 (52,2)	7 (30,4)	4 (17,4)	23	0,44
CR	354.347	14 (51,9)	2 (7,4)	11 (40,7)	27	0,85
LC	332.273	25 (83,4)	1 (3,3)	4 (13,3)	30	1,00
LO	219.579	5 (35,7)	6 (42,9)	3 (21,4)	14	0,71
MB	830.087	23 (56,1)	5 (12,2)	13 (31,7)	41	0,55
MI	3.077.591	80 (41,5)	32 (16,6)	81 (41,9)	193	0,70
MN	403.088	7 (87,5)	0 (0)	1 (12,5)	8	0,22
PV	529.359	13 (61,9)	3 (14,3)	5 (23,8)	21	0,44
SO	180.828	17 (94,4)	1 (5,6)	0 (0)	18	1,11
VA	863.528	27 (69,2)	3 (7,7)	9 (23,1)	39	0,50
Totale	9.657.317	291 (51,1)	86* (15,1)	192 (33,8)	569*	0,65

*Per 11 casi la provincia non è nota

4.2 Caratteristiche microbiologiche ed epidemiologia molecolare

Dall'attività di sorveglianza di laboratorio sono stati collezionati 289 isolati clinici di *L. monocytogenes*, sui quali è stato possibile effettuare la caratterizzazione fenotipica.

4.2.1 Caratteristiche fenotipiche: tipizzazione sierologica

Gli isolati sono risultati appartenenti a 4 sierotipi: 1/2a (sierogruppo 1, n=171), 4b (sierogruppo 4, n=75), 1/2b (sierogruppo 3, n=33), 1/2c (sierogruppo 2, n=7), con una netta prevalenza dei sierotipi 1/2a e 4b rispettivamente corrispondenti al 60,9 e 26,3% degli isolati. I sierotipi meno frequenti sono stati invece l'1/2b (10,4%) e l'1/2c (2,4%) (Tabella 8). In particolare si osserva che il sierotipo 1/2a mostra un *trend* di crescita dal 2006 (n=7, 41,2%) al 2014 (n=34, 63%), con un picco nel 2011 (n=36, 81,8%). Viceversa il sierotipo 4b risulta essere in lieve decrescita dal 2006 (n=5, 29,4%) al 2014 (n=20,4), con un picco nel 2010 (n=14, 33,3%) (Figura 14).

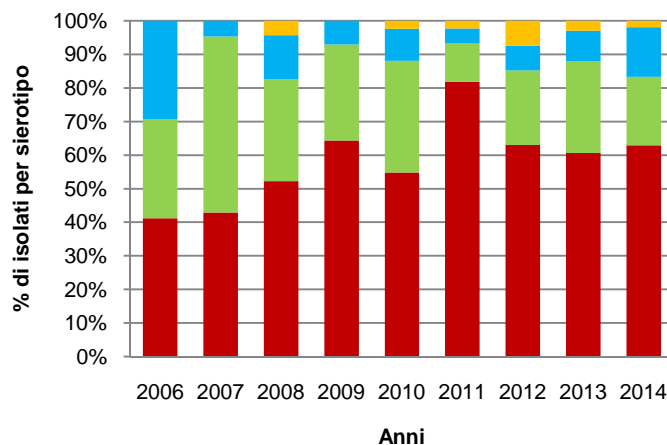


Figura 14 Distribuzione dei sierotipi di *Listeria monocytogenes* nel periodo 2006-2014 in Regione Lombardia, Italia

4.2.2 Caratteristiche genotipiche: Multi-Locus Sequence Typing

La genotipizzazione mediante MLST ha permesso di identificare 52 differenti *Sequence Types* (STs). I 6 STs più comunemente rilevati sono: **ST38** (n=43, 14,9%), **ST1** (n=37, 12,8%), **ST8** (n=27, 9,3%), **ST155** (n=22, 7,6%), **ST2** (n=17, 5,9%) e **ST3** (n=17, 5,9%), rappresentando nel totale il 56,4% degli isolati (Figura 15).

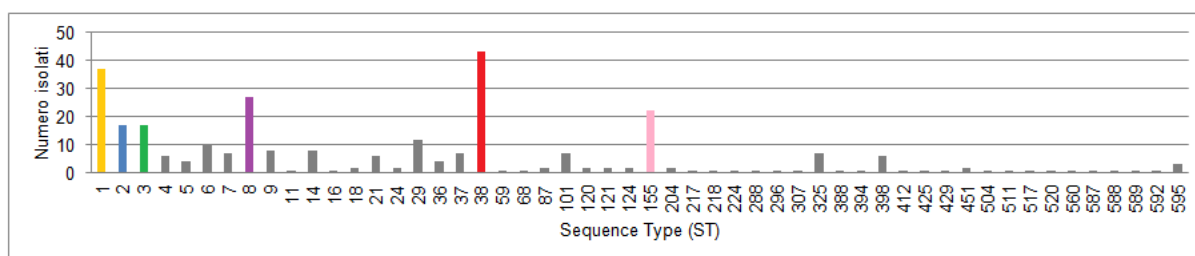


Figura 15. Distribuzione dei Sequence Types (STs) di *Listeria monocytogenes* nel periodo 2006-2014 in Regione Lombardia, Italia

Considerando il Clonal Complex (CC) i 52 STs clusterizzano in 33 CC, tra i quali 6 risultano prevalenti: **CC101** (51, 17,6%), **CC1** (41, 14,2%), **CC8** (31, 10,7%), **CC155** (22, 7,6%), **CC2** (18, 6,2%) e **CC3** (18, 6,2%), rappresentando nel totale il 62,5% degli isolati (Figura 16). I sei principali CC raggruppano diversi STs:

- il CC101 comprende gli isolati appartenenti ai ST38 (n=43), ST101 (n=7) e ST592 (n=1).
- il CC1 comprende gli isolati appartenenti ai ST1 (n=37), ST11 (n=1) e ST595 (n=3).
- il CC8 comprende gli isolati appartenenti ai ST8 (n=27), ST16 (n=1), ST120 (n=2) e ST588 (n=1);
- il CC155 comprende gli isolati appartenenti al ST155 (n=22);
- il CC2 comprende gli isolati appartenenti ai ST2 (n=17) e ST589 (n=1);
- il CC3 comprende gli isolati appartenenti ai ST3 (n=17) e ST68 (n=1);
- non appartengo ad uno specifico CC: l'ST36, ST124, ST307, ST429, ST517 e ST560;

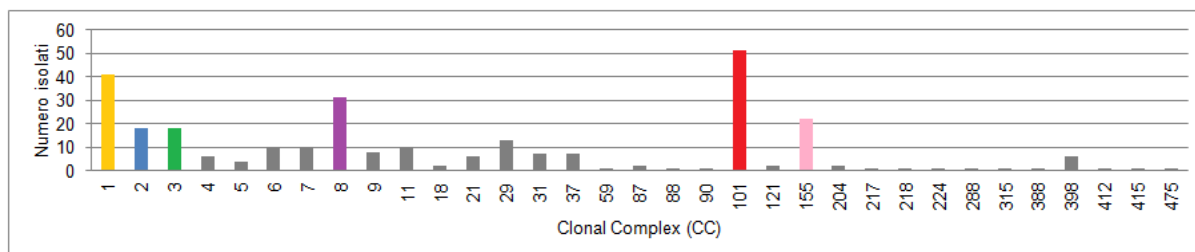


Figura 16. Distribuzione dei Clonal Complexes (CCs) di *Listeria monocytogenes* nel periodo 2006-2014 in Regione Lombardia, Italia

4.3 Distribuzione spazio-temporale dei principali genotipi

Per i sei STs risultati più degni di attenzione in questo paragrafo viene descritta la distribuzione spazio-temporale.

Come riportato nella Tabella 8, l'incidenza provinciale della listeriosi per anno sui totali casi osservati è variabile, registrando il più basso tasso di incidenza nella provincia di Mantova (0,22 per 100.000 abitanti) e il più alto nella provincia di Sondrio (1,11 per 100.000 abitanti). Mentre analizzando i tassi di incidenza per provincia dei 6 principali STs ottenuti attraverso la sorveglianza di laboratorio (Tabella 10), la provincia di Sondrio non risulta essere coinvolta nella distribuzione spaziale. Il dato risulta essere coerente, invece, per la provincia di Mantova in cui si registra il più basso tasso di incidenza per anno tra i casi osservati e nessun caso appartenente ai 6 STs.

Tabella 8: incidenza per provincia dei principali 6 STs identificati in questo studio e in Regione Lombardia.

Province	Incidenza media annua per 100.000 abitanti						Listeriosi Lombardia
	ST1	ST2	ST3	ST8	ST38	ST155	
BG	0,06	0,01	0,02	0,06	0,19	0,02	1,02
BS	0,05	0,01	0,01	0,02	0,02	0,05	0,52
CO	0,02	0,02	0,04	0,00	0,02	0,02	0,44
CR	0,00	0,06	0,00	0,03	0,03	0,06	0,85
LC	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00	0,03	1,00
LO	0,00	0,00	0,10	0,10	0,15	0,10	0,71
MB	0,03	0,00	0,00	0,07	0,04	0,01	0,55
MI	0,08	0,04	0,03	0,03	0,04	0,01	0,70
MN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
PV	0,00	0,02	0,00	0,02	0,04	0,06	0,44
SO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11
VA	0,01	0,00	0,03	0,01	0,03	0,01	0,50
Totale	0,04	0,02	0,02	0,03	0,05	0,03	0,65

Sequence Type 1

Il ST1 comprende in totale 37 isolati di sierotipo 4b. I casi sono stati riscontrati durante tutto il periodo oggetto dello studio e si sono verificati solo in 7 province (figura 17). L'incidenza regionale media annua è 0,04 per 100.000 abitanti; la provincia maggiormente interessata è Milano con una incidenza provinciale di 0,08 per 100.000 abitanti seguita da Bergamo e Brescia (rispettivamente 0,06 e 0,05 per 100.000 abitanti). Nella Tabella 9 sono riportati i dati sugli isolamenti di *Lm* ST1 riportati dal database PasteurMLST: si osserva un'ampia distribuzione, soprattutto in Europa, comprendente sia isolati da casi umani (ivi compresi 3 episodi epidemici) che di origine ambientale-alimentare.

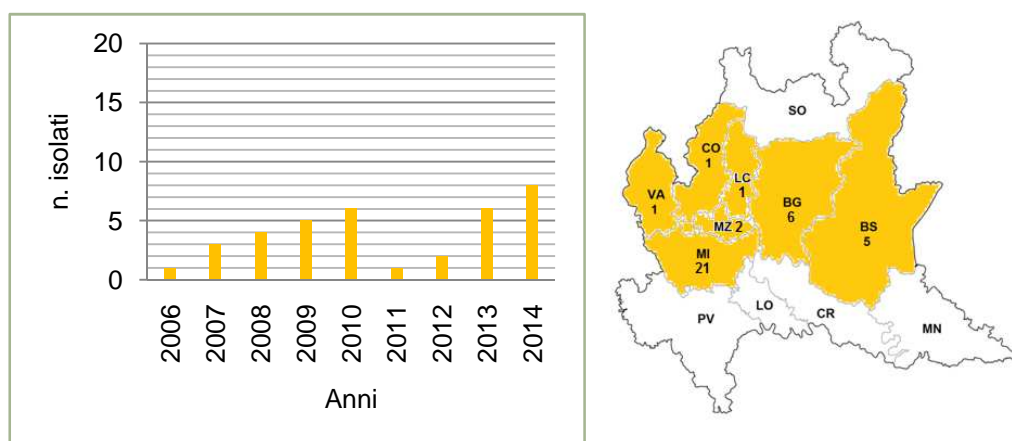


Figura 17: distribuzione spazio-temporale del ST1 in Regione Lombardia nel periodo 2006-2014



Pasteur MLST – ST1									
n. isolati	327	Profilo MLST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA
			3	1	1	1	3	1	3
Area geografica (n)	Europa (143), Oceania (63), Nord America (38), Sud America (30), Asia (17), Medio oriente (8), America centrale (4), Africa (2)								
Origine (n)	Umano (164), Ambientale (51), Animale (40), Alimenti (31), Mangimi (13), Ambienti di produzione (12)								
Alimenti	Burro, Latte, Formaggio, Frutta, Vegetali, Prosciutto, Carne di manzo, maiale e pollo.								
Outbreak	California, USA, 1985; Francia, 1989; Svezia 1995.								

Tabella 9: isolati ST1 riportati dal Database Pasteur MLST (Paris, France): area geografica, origine, alimenti coinvolti e *outbreak* segnalati.

Sequence Type 2

Il ST2 comprende in totale 17 isolati di sierotipo 4b. I casi sono stati riscontrati nel corso degli anni (2006-2014) con un andamento che evidenzia una persistenza di questo ceppo nel tempo (Figura 18). La consultazione del database PasteurMLST (Tabella 10) ha evidenziato anche per questo ST una ampia diffusione soprattutto in Europa (59,3% degli isolati) ma anche in altre aree geografiche e anche la segnalazione di un unico evento epidemico che riguarda il nostro Paese (nord Italia 1997).

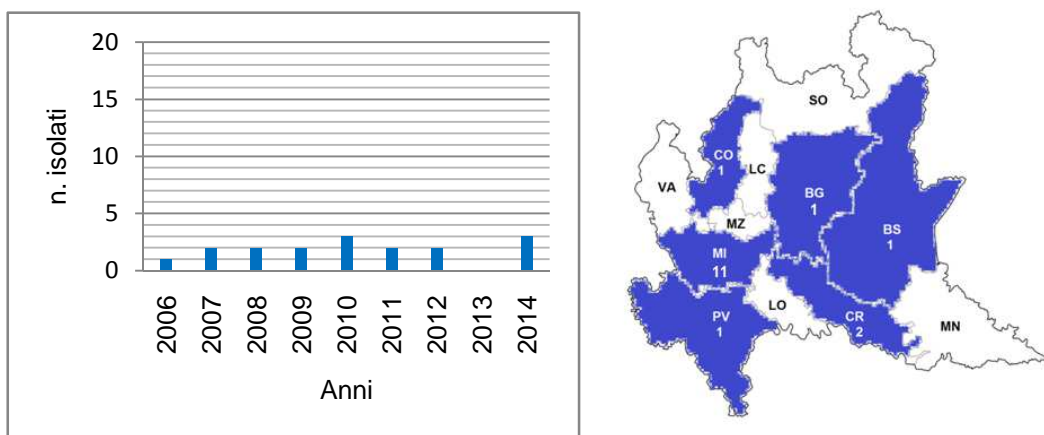


Figura 18: distribuzione spazio-temporale del ST2 in Regione Lombardia nel periodo 2006-2014



Pasteur MLST – ST2									
n. isolati	213	Profilo MLST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA
			1	1	11	11	2	1	5
Area geografica (n)	Europa (121), Oceania (34), Nord America (14), Asia (12), Sud America (11), Africa (9), Medio oriente (3)								
Origine (n)	Umano (93), Alimenti (33), Animale (30), Ambientale (25), Mangimi (9), Ambienti di produzione (8)								
Alimenti	Frutta, Pesce, Prosciutto, Carne di maiale e pollo								
Outbreak	Nord Italia, Aureli 1997								

Tabella 10: isolati ST2 riportati dal Database Pasteur MLST (Paris, France): area geografica, origine, alimenti coinvolti e outbreak segnalati.

Sequence Type 3

Il ST3 comprende in totale 17 isolati di sierotipo 1/2b riscontrati nel periodo di studio (2006-2014) con un andamento altalenante (Figura 19). L'incidenza regionale media annua è 0,02 per 100.000 abitanti; la provincia maggiormente interessata è Lodi con una incidenza provinciale di 0,1 per 100.000 abitanti seguita da Como, Lecco Varese e Milano con una incidenza media annua di 0,03-0,04 per 100.000 abitanti. Dal database PasteurMLST (Tabella 11) risultano isolamenti diffusi, con una prevalenza dei casi umani in Australia.

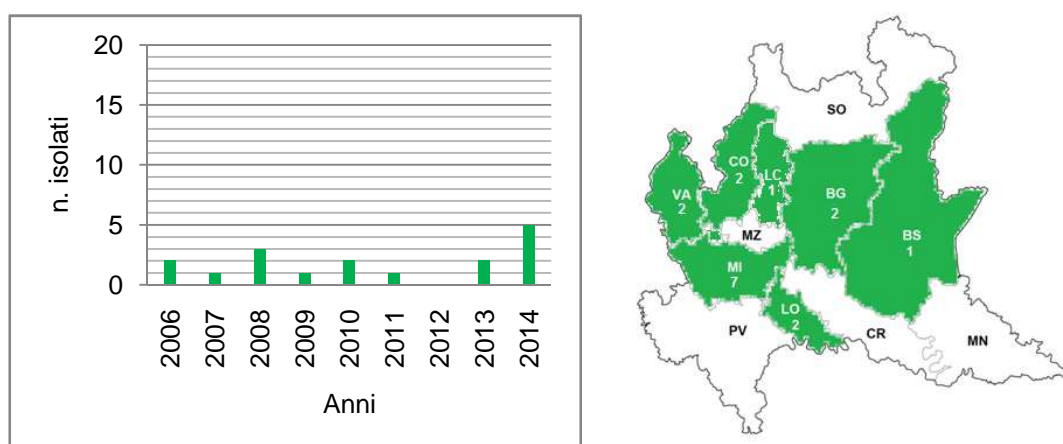


Figura 19: distribuzione spazio-temporale del ST3 in Regione Lombardia nel periodo 2006-2014



Pasteur MLST – ST3									
n. isolati	253	Profilo MLST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA
			4	4	4	3	2	1	5
Area geografica (n)	Oceania (152), Europa (51), Sud America (17), Asia (10), Nord America (6), Medio oriente (3), Africa (2)								
Origine (n)	Alimenti (95), Umano (94), Ambienti di produzione (16), Ambientale (15), Animale (4)								
Alimenti	Burro, Latte, Formaggio, Vegetali, Prosciutto, Pesce, Gamberetti, Carne di cavallo e pollo.								
Outbreak	Nord America, 1994								

Tabella 11: dati relativi al ST3 provenienti dal Database Pasteur MLST (Paris, France): area geografica, origine, alimenti coinvolti e outbreak segnalati.

Sequence Type 8

Il ST8 comprende in totale 27 isolati di sierotipo 1/2a. I casi sono stati riscontrati durante il periodo in esame con un andamento irregolare, caratterizzato dal picco riscontrato nel biennio 2011-2012 (14 casi totali) (Figura 20). L'incidenza regionale media annua è 0,03 per 100.000 abitanti, la provincia maggiormente interessata è Lodi con una incidenza provinciale di 0,1 per 100.000 abitanti seguita da Monza Brianza e Bergamo (rispettivamente 0,07 e 0,06 per 100.000 abitanti). Solo in un caso, non epidemico verificatosi a Milano, è stato possibile rintracciare l'alimento coinvolto (Tris di formaggi). Nella Tabella 12 sono riportati i dati derivanti dalla consultazione del database PasteurMLST: si osserva che la maggior parte degli isolati ST8 è stata identificata in Europa.

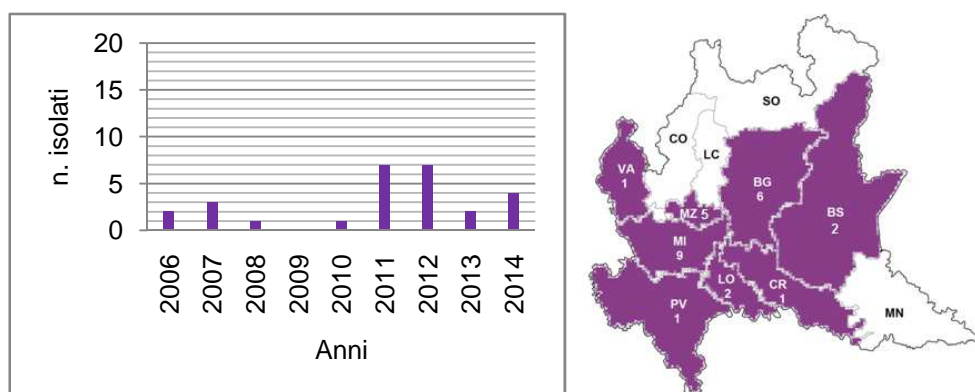


Figura 20: distribuzione spazio-temporale del ST8 in Regione Lombardia nel periodo 2006-2014



Pasteur MLST – ST8									
n. isolati	37	Profilo MLST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA
			5	6	2	9	5	3	1
Area geografica (n)	Europa (20), Sud America (6), Oceania (4), Asia (2), Africa (2)								
Origine (n)	Umano (15), Alimenti (9), Ambienti di produzione (5), Animale (4), Mangimi (1)								
Alimenti	Carne di maiale, Funghi, Prosciutto, Peperoncino, Pesce e prodotti ittici								
Outbreak	Nessun outbreak segnalato								

Tabella12: isolatiST8 riportati dal Database Pasteur MLST (Paris, France): area geografica, origine, alimenti coinvolti e outbreak segnalati.

Sequence Type 38

Il ST38 comprende in totale 43 isolati di sierotipo 1/2a. I casi sono evidentemente concentrati nel triennio 2009-2011 per un totale di 36 casi (in media di 12 per anno) (Figura 21). Avendo ipotizzato, in base a questa particolare distribuzione spazio-temporale, l'insorgenza di un *outbreak* nel triennio 2009-2011 - non rilevato dalle autorità sanitarie locali – sugli isolati ST38 abbiamo applicato una ulteriore analisi molecolare (MVLST) ed approfondito le indagini, i cui risultati sono riferiti nel paragrafo 4.4.1. L'incidenza regionale media annua è 0,05 per 100.000 abitanti, la provincia maggiormente interessata è Bergamo con una incidenza provinciale di 0,19 per 100.000 abitanti seguita da Lodi (0,15 per 100.000 abitanti). Per questo ST che rappresenta il più frequente degli STs riscontrati nella nostra casistica, il database PasteurMLST (Tabella 13) riporta solo tre isolamenti, tutti da casi di infezione nell'uomo.

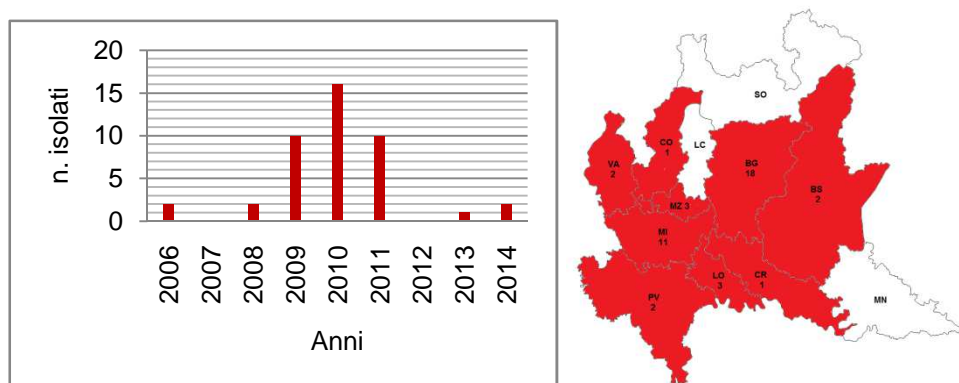


Figura 21: distribuzione spazio-temporale del ST38 in Regione Lombardia (2006-2014)



Pasteur MLST – ST38									
n. isolati	3	Profilo MLST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA
			7	15	15	8	11	14	9
Area geografica (n)	Europa (2), Oceania (1)								
Origine (n)	Umano (3): Francia 1997, Oceania 2009, Germania 2011								
Alimenti	-								
Outbreak	Nessun outbreak segnalato								

Tabella 13: isolati ST38 riportati dal Database Pasteur MLST (Paris, France): area geografica, origine, alimenti coinvolti e *outbreak* segnalati.

Sequence Type 155

Il ST155 comprende in totale 22 isolati di sierotipo 1/2a. L'identificazione di questo ST inizia con un caso nel 2008, seguito da un picco nel 2011 (n=10) e un successivo picco nel biennio 2013-2014 (n=5 e n=6), di cui 3 casi legati alla gravidanza nella provincia di Brescia strettamente correlati nello spazio e nel tempo (Figura 22). L'incidenza regionale media annua è 0,03 per 100.000 abitanti, la provincia maggiormente interessata è Lecco con una incidenza provinciale di 0,1 per 100.000 abitanti seguita da Cremona, Pavia e Brescia (0,05-0,06 per 100.000 abitanti). La distribuzione del ST155 suggerisce l'ipotesi di un *outbreak* non rilevato dalle autorità sanitarie locali. Nella Tabella 14 sono riportati i risultati della consultazione del database PasteurMLST: oltre la metà degli isolati ST155 sono riportati dall'Australia.

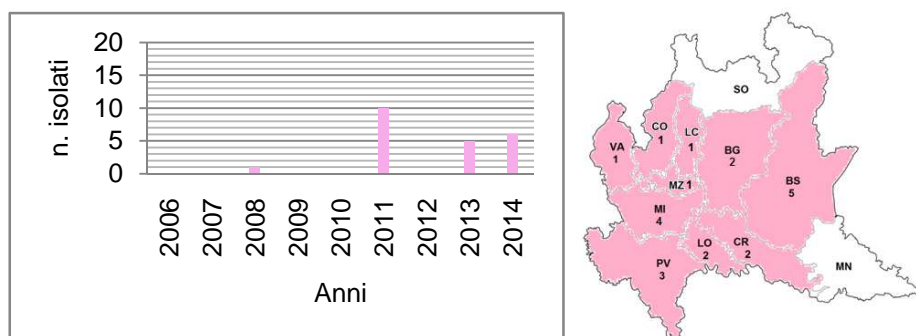


Figura 22: distribuzione spazio-temporale del ST155 in Regione Lombardia nel periodo 2006-2014.



Pasteur MLST – ST155									
n. isolati	72	Profilo MLST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA
			7	10	16	7	5	2	1
Area geografica (n)	Oceania (39), Europa (18), Asia (10), Nord America (3), Sud America (1), America centrale (1)								
Origine (n)	Umano (32), Alimenti (17), Animale (8), Mangimi (7), Ambientale (3), Ambienti di produzione (2)								
Alimenti	Frutta, Carne, Gelato, Latte, Vegetali, Prodotti ittici								
Outbreak	Nessun outbreak segnalato								

Tabella 14: isolati ST155 riscontrati dal Database Pasteur MLST (Paris, France): area geografica, origine, alimenti coinvolti e *outbreak* segnalati.

4.4 Compendio: caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei principali genotipi

In Tabella 15 sono riassunte le caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei principali STs. La distribuzione dei sierotipi nei casi (n=163) appartenenti ai 6 principali STs risulta essere concorde con i dati rilevati tra gli isolati oggetto dello studio (n=289), riscontrando le seguenti percentuali: 56,4% vs 60,9% (1/2a), 33,1% vs 26,3% (4b) e 10,4% vs 10,4% (1/2b). I casi legati alla gravidanza non sono significativamente correlati ad uno dei due sierotipi 1/2a (n=10, 10,9%) o 4b (n=5, 9,3%). Nessun caso appartenente al sierotipo 1/2b è associato alla gravidanza, mentre la più alta percentuale di casi legati alla gravidanza viene rilevata tra gli isolati ST155 (18,2%).

Il sierotipo 1/2b risulta essere meno associato (35,3%) ai soggetti anziani di età superiore ai 70 anni, rispetto ai sierotipi 1/2a e 4b (49,1%); contestualmente, per questo sierotipo appartenente al ST3, la percentuale dei casi con condizioni predisponenti è maggiore (88,2%).

La patologia si manifesta principalmente con forme setticemiche per tutti i casi in esame, mentre la letalità risulta essere maggiore (54,5%) per l'ST2 (4b) e minore (18,6%) per l'ST155 (1/2a).

Tabella 15: descrizione dei principali 6 STs identificati in questo studio: dati relativi agli isolati e alle caratteristiche cliniche dei casi.

ST	DATI ISOLATO			Genere M/F ^a	Età (>70)	DATI CLINICI				
	n. isolati	Sierotipo	CC			N. casi associati alla gravidanza (%)	Tipo di infezione ^a		N. casi con condizioni predisponenti note (%) ^{a, b}	Letalità ^a
							Setticemia	Meningite		
1	37	4b	1	21/13	19	3 (8,1)	23	13	25 (67,6)	25,0%
2	17	4b	2	8/7	9	2 (11,8)	11	1	11 (64,7)	54,5%
3	17	1/2b	3	10/7	6	0 (0)	11	1	15 (88,2)	30,8%
8	27	1/2a	8	15/8	12	4 (14,8)	11	6	17 (63,0)	31,3%
38	43	1/2a	101	17/24	22	2 (4,7)	21	11	35 (81,0)	28,0%
155	22	1/2a	155	10/8	10	4 (18,2)	11	6	10 (45,5)	18,6%

a: non sono inclusi i casi associati alla gravidanza

b: per alcuni casi le informazioni relative alle condizioni predisponenti non sono state segnalate.

4.5 Sequence Type 38: ceppo emergente in Regione Lombardia

ST38, definibile come ST emergente in Regione Lombardia, suscita particolare interesse per la sua particolare distribuzione spazio-temporale dei casi, con un'incidenza media annua di 0,5 per 100.000 abitanti. Per verificare l'ipotesi che il ST38 sia stato responsabile di un out break, tutti gli isolati sono stati ulteriormente analizzati attraverso PFGE e MVLST.

Analisi molecolare *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

Tutti gli isolati analizzati attraverso la PFGE mostrano un elevato livello di similarità. I profili risultano essere identici fatta eccezione per due ceppi che a differenza degli altri, presentano una doppia banda tra i frammenti a più alto peso molecolare. I profili molecolari degli isolati ST38 sono stati inseriti nel Database Europeo della rete TESSy (ECDC, Stoccolma) attraverso la collaborazione del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare - Istituto Superiore di Sanità di Roma. La TESSy *cluster analysis* conferma l'elevata similarità dei ceppi assegnando un codice ufficiale al pulsotipo sia per l'enzima *Ascl* che per l'enzima *Apal*, nominandoli rispettivamente *Ascl.0099* e *Apal0030*. Mentre i pulsotipi non correlanti al 100% per la presenza della doppia banda sono stati codificati per i due enzimi *Ascl* e *Apal*, rispettivamente *Ascl.0103* e *Apal.0178* (Figura 23).

Dall'analisi di comparazione dei profili molecolari non è stato riscontrato alcun profilo correlante a livello europeo.



Figura 23: Database Europeo della rete TESSy: cluster analysis dei pulsotipi degli isolati ST38

Analisi molecolare *Multi Virulence Locus Sequence Typing* (MVLST)

Gli isolati ST38 sono stati analizzati attraverso MVLST presso il *Food Science Department - The Pennsylvania State University* (USA). Gli isolati caratterizzati e sequenziati per i 6 geni di virulenza risultano appartenere a due diversi Virulence Type: VT80 e VT104. I due VT differiscono per un *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) collocato in posizione 90 del gene di virulenza *dal*, in cui una singola base è mutata da citosina (C) nel VT80 a timina (T) nel VT104 (Figura 24). Si tratta dunque di una mutazione puntiforme e nello specifico di una transizione pirimidinica di tipo missenso non neutra, in cui la sostituzione della base azotata (C>T) all'interno della sequenza di DNA comporta una modifica a livello della sequenza amminoacidica (Istidina, His > Tirosina, Tyr) (Figura 25).



Figura24: Allineamento e comparazione delle sequenze nucleotidiche del gene *dal* attraverso il software *MEGA*.

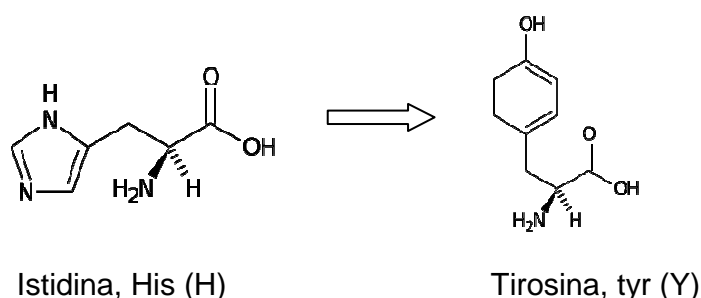


Figura 25: Modifica a livello amminoacidico da Istidina (basico) a Tirosina (idrofilo aromatico) derivante dalla mutazione missenso di tipo non neutra.

Nella Figura 26 è rappresentata la distribuzione nel tempo degli isolati ST38, VT80 e VT104. L'analisi MVLST permette di osservare una diversa distribuzione temporale per i due VTs: VT80 mostra un andamento sporadico dei casi dal 2006 al 2014, che conferma una persistenza di questo ceppo in Regione Lombardia, mentre gli isolamenti VT104 risultano concentrati in una precisa finestra temporale (2009-2011) con un andamento che rafforza l'ipotesi di un evento epidemico non riconosciuto dalle autorità sanitarie.

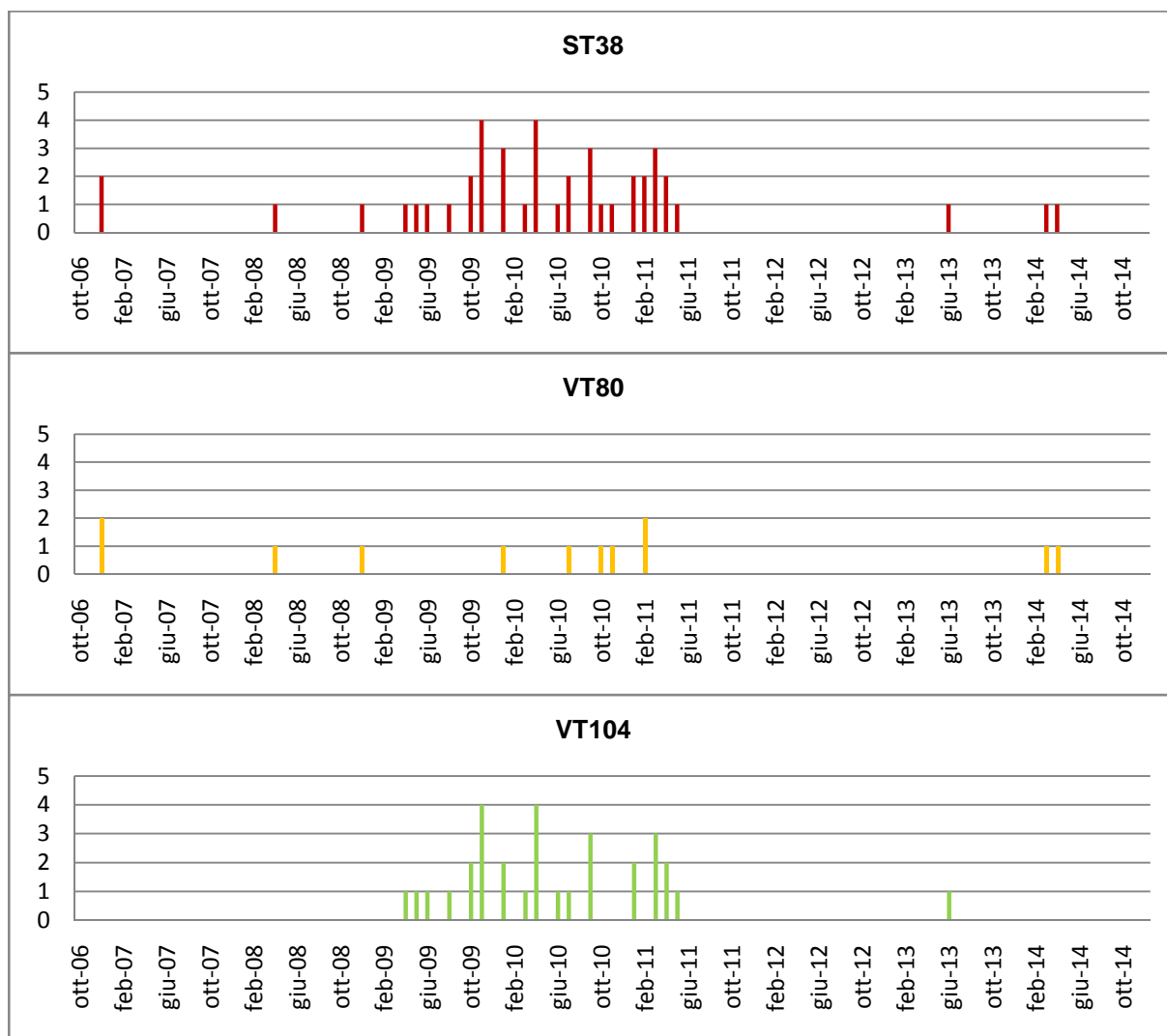


Figura 26: distribuzione temporale degli isolati appartenenti al ST38 e scomposizione secondo l'analisi MVLST nelle sue due componenti VT80 e VT104.

Nella Figura 27 è rappresentata la distribuzione spaziale degli isolati ST38 e la differente distribuzione geografica degli isolati VT80 e VT104:

- VT80 si colloca nella parte Centro-occidentale della Regione Lombardia; la provincia con il maggior numero dei casi è Bergamo (n=5), seguita da Milano (n=2), Pavia (n=2), Varese (n=2), Monza Brianza (n=1) e Como (n=1).
- VT104 si colloca nella parte Centro-orientale della Regione Lombardia e la provincia con il maggior numero di casi è Bergamo (n=14), seguita da Milano (n=9), Lodi (n=3), Monza Brianza (n=2), Brescia (n=2) e Cremona (n=1).

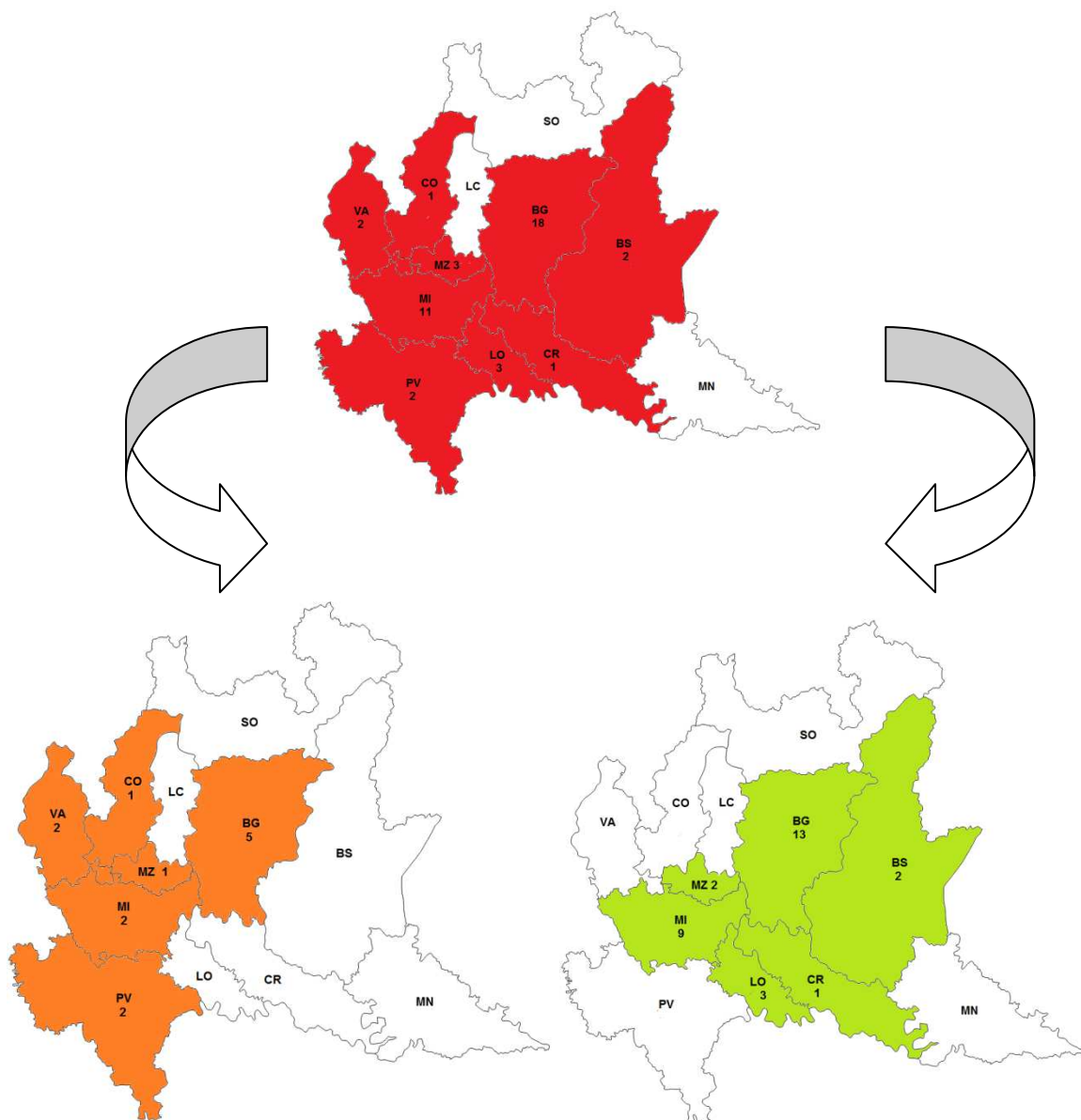


Figura27: distribuzione spaziale degli isolati appartenenti al ST38 e scomposizione secondo l'analisi MVLST nelle sue due componenti VT80 e VT104.

La provincia con la più alta incidenza per anno per il ST38 è Bergamo (0,19 per 100.000 abitanti) seguita da Lodi (0,15 per 100.000 abitanti). Mentre se consideriamo la scomposizione del ST38 nei due VT80 e VT104, notiamo che per il VT80 la provincia con la maggiore incidenza per anno è Bergamo (0,05 per 100.000 abitanti) seguita da Pavia (0,04 per 100.000 abitanti) e Varese (0,03 per 100.000 abitanti), mentre per il VT104 la maggiore incidenza per anno è nella provincia di Lodi (0,15 per 100.000 abitanti) seguita da Bergamo (0,14 per 100.000 abitanti) sebbene il maggior numero dei casi viene rilevato a Bergamo (n=13) e Milano (n=9) (Tabella 16).

Incidenza media annua per 100.000 abitanti													
	BG	BS	CO	CR	LC	LO	MB	MI	MN	PV	SO	VA	Tot
ST38	0,19	0,02	0,02	0,03	0,00	0,15	0,04	0,04	0,00	0,04	0,00	0,03	0,05
VT80	0,05	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,04	0,00	0,03	0,02
VT104	0,14	0,02	0,00	0,03	0,00	0,15	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03

Tabella16: incidenza media annua per provincia degli isolati appartenenti al ST38, VT80 e VT104.

Inchieste epidemiologiche

Data la conferma dell'ipotesi di un evento epidemico sostenuto da uno stipite di *Lm* ST38-VT104 ci siamo attivati per recuperare, attraverso una richiesta ufficiale da parte della Direzione Generale Salute della Regione Lombardia, le indagini epidemiologiche condotte dalle rispettive ASL. La collaborazione ha permesso di consultare le inchieste riguardanti 13 casi, in particolare 11 dell'ASL di Bergamo e 2 dell'ASL di Milano (Tabella 17) e di rilevare una forte associazione con la categoria alimentare dei formaggi, e per alcuni casi con una specifica tipologia (taleggio, formaggi molli e freschi). In particolare, è emerso che a seguito dell'attività ispettiva presso il domicilio di un paziente (corrispondente all'isolato LMO 122) è stata riscontrata la positività per *Listeria* nella porzione di taleggio conservata in frigorifero. Gli isolati alimentari (n=3), conservati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna (IZSLER), e quello isolato dal paziente sono stati quindi sottoposti ad ulteriori approfondimenti molecolari; in particolare è stata eseguita presso l'IZSLER la ribotipizzazione che, identificando l'appartenenza al ribotipo DUP18645 (gruppo 32) di tutti gli stipiti indagati, ne ha confermato la stretta correlazione.

La pulsotipia, sia con l'enzima *Ascl* che *Apal* ha inoltre evidenziato la stretta correlazione tra tutti gli isolati umani appartenenti al ST38 e gli stipiti isolati dal campione di taleggio (Figura 28).

Da ultimo, data la correlazione osservata tra gli isolati da taleggio ed il ceppo umano appartenente al VT104 sulla base dei risultati della PFGE e della ribotipia, anche il ceppo di origine alimentare è stato sottoposto alla analisi MVLST essendo lo stipite isolato dall'alimento risultato appartenente al VT104, si è pervenuti ad una ulteriore conferma della associazione tra il caso umano LMO 122, e molto probabilmente di tutti i casi ST38-VT104, con il consumo di taleggio contaminato.

Tabella 17: Dati derivanti dalle inchieste epidemiologiche sui casi coinvolti nel sospetto evento epidemico da *Lm* ST38

COD. LMO	ST	VT	ASL	ALIMENTI A RISCHIO CONSUMATI	CONTROLLI C/O DOMICILIO
LMO 112	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Verdura non lavata 	Non eseguiti perché avanzi non più disponibili
LMO 119	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Verdure 	Non eseguiti perché avanzi non più disponibili
LMO 120	38	80	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Verdure 	Non eseguiti
LMO 122	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi 	<ul style="list-style-type: none"> Campionamento formaggi vari: positivo il taleggio*
LMO 123	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Insalata non lavata 	Non eseguiti perché avanzi non più disponibili
LMO 125	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Verdure 	Non eseguiti perché avanzi non più disponibili
LMO 145	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Affettati 	Non eseguiti perché avanzi non più disponibili
LMO 147	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Affettati 	<ul style="list-style-type: none"> Tamponi superficiali: negativi
LMO 172	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi (taleggio consumato con la crosta) 	<ul style="list-style-type: none"> Campionamento taleggio: negativo Tamponi superficiali: negativi
LMO 175	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi Carne talvolta consumata cruda 	Non eseguiti perché avanzi non più disponibili
LMO 253	38	104	BG	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi 	<ul style="list-style-type: none"> Campionamento taleggio: negativo
LMO 302	38	80	MI	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi morbidi 	<ul style="list-style-type: none"> Supposta fonte di origine nosocomiale
LMO 134	38	104	MI	<ul style="list-style-type: none"> Formaggi industriali freschi 	<ul style="list-style-type: none"> Non segnalato

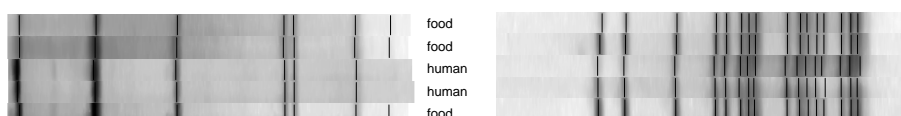


Figura 28: profili PFGE degli isolati alimentari e umano (paziente LMO122)

4.6 Modelli applicati in epidemiologia molecolare

Nella figura 29 è rappresentata l'applicazione del Modello riportato da Smith et al. ai dati MLST degli isolati di *Lm* in Regione Lombardia. Il modello per la struttura epidemica della popolazione è quindi composto da una parte di sfondo "background" comprendente i 37 STs rari e non correlati e da 6 clusters di STs molto frequenti denominati CCs, in particolare CC1, CC2, CC3, CC8, CC101 e CC155. Secondo questo modello, quindi, i CCs emergono da un "founding ST" (posto alla base del cono) e successivamente persistono per decenni.

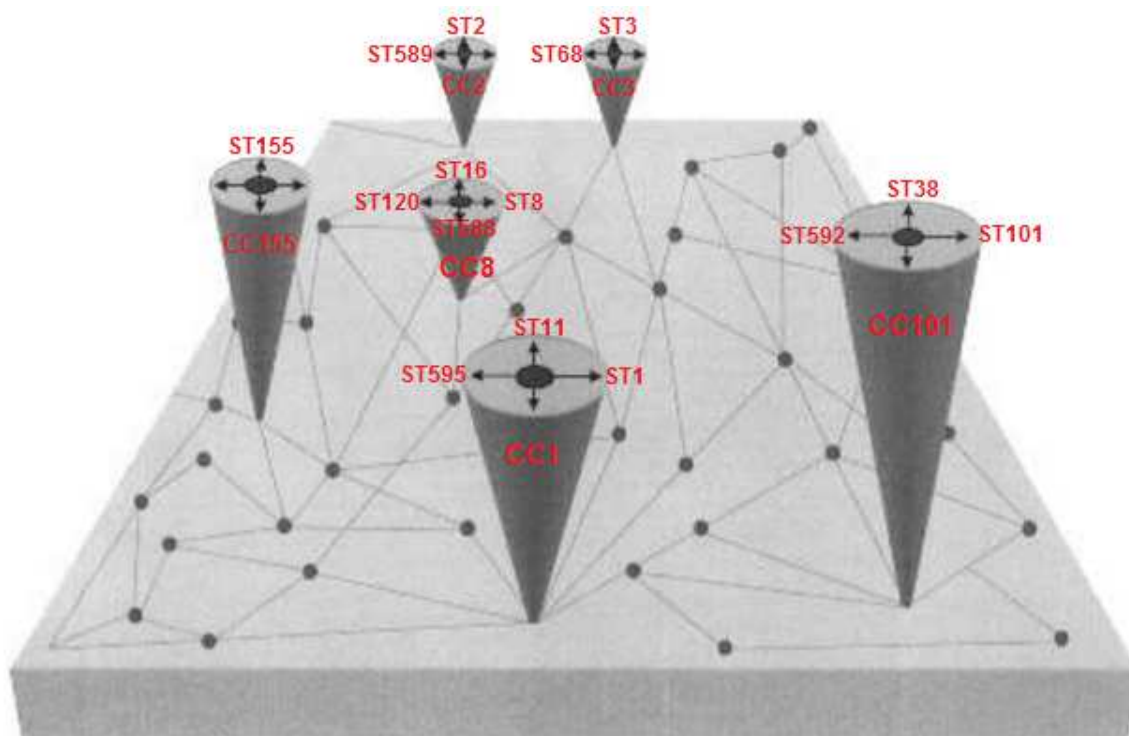


Figura 29: modello della struttura epidemica della popolazione attraverso MLST in Regione Lombardia 2006-2014 (CC=Clonal Complex, ST= Sequence Type)

Nella figura 30 è rappresentata l'applicazione del modello evolutivo dei cloni epidemici [Oyarzabal O.A. and Kathariou S, 2014] ai dati MVLST degli isolati di *Lm* in Regione Lombardia. Il modello per la struttura epidemica della popolazione è quindi composto da una parte di sfondo "background" comprendente diversi VTs, in cui singoli VT altamente adattati emergono come cloni epidemici (ECs) che si disseminano ampiamente nel

tempo e nello spazio senza una mutazione dei geni di virulenza poiché i fattori di virulenza sono sotto forte pressione selettiva negativa.

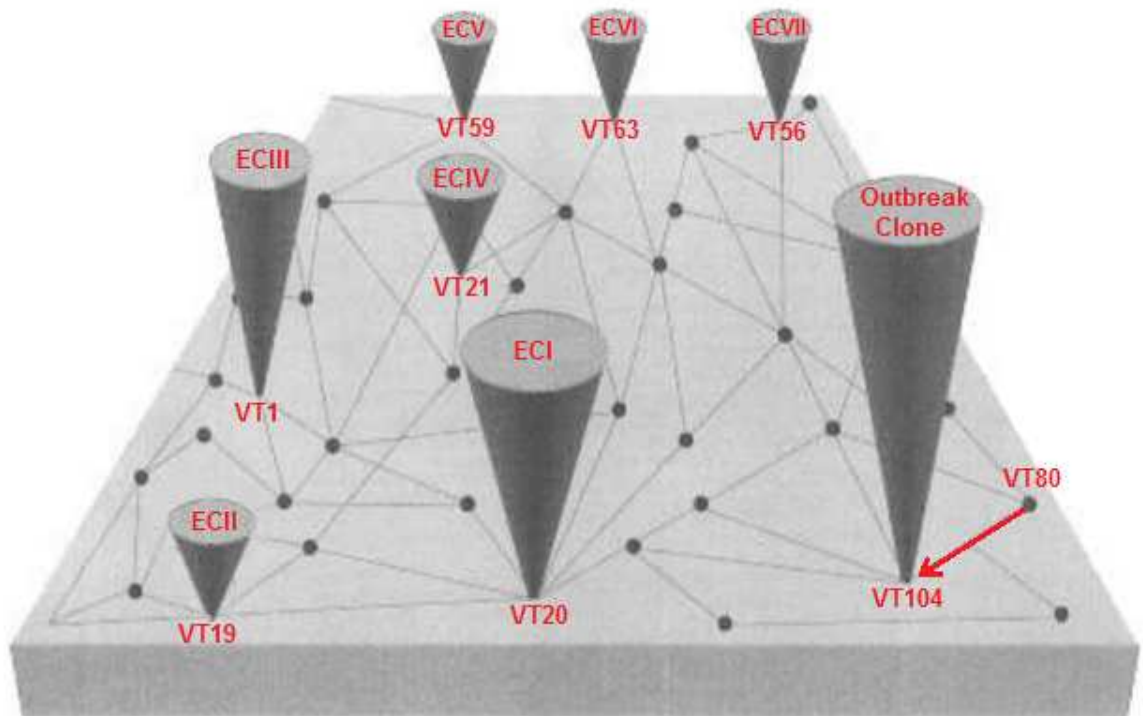


Figura 30: modello della struttura epidemica della popolazione attraverso MVLST in Regione Lombardia (2006-2014) e principali Epidemic Clone (EC=Epidemic Clone, VT=Virulence Type).

5 DISCUSSIONE

La listeriosi invasiva è considerata una delle più gravi malattie infettive a trasmissione alimentare per la severità della sintomatologia (setticemia e meningite), l'elevato tasso di ospedalizzazione (maggiore del 90%) e di letalità (20-30%). Nell'ambito delle malattie trasmesse da alimenti e acqua, l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - l'agenzia indipendente dell'Unione Europea che monitora la diffusione delle malattie infettive - ha inserito la listeriosi fra le sei priorità già dal 2008, insieme a salmonellosi, campylobacteriosi, infezioni da *Escherichia coli* verocitotossico, shigellosi ed yersiniosi (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-and-waterborne-diseases-surveillance-report.pdf>).

5.1 Listeriosi in Lombardia: epidemiologia descrittiva

In questo studio ci siamo proposti di valutare l'incidenza della listeriosi rilevata dal sistema di sorveglianza istituito in Regione Lombardia, che in Italia si avvicina di più agli standard di controllo epidemiologico europei. Sul modello della sorveglianza epidemiologica europea, la sorveglianza della listeriosi in Lombardia si basa sull'integrazione tra il sistema di sorveglianza passivo delle notifiche ufficiali (MAINF), e il sistema di sorveglianza attivo (LabSS), basato sulla rete dei laboratori. In base ai dati provenienti dai Sistemi di Sorveglianza MAINF e LAB, tra il 2006 e il 2014, si è avuto un progressivo aumento delle segnalazioni dei casi notificati per anno (da 35 a 56) come pure degli isolati inviati al nostro laboratorio (da 17 a 54). È noto che l'investimento nelle attività di sorveglianza porta a rilevare un incremento dei casi riportati [Hedberg C., 2006]. Nel nostro studio, tale correlazione positiva è da ritenersi confermata. Infatti, il miglioramento della sensibilità ha probabilmente riguardato la sorveglianza di laboratorio, che ha richiesto una progressiva sensibilizzazione dei punti periferici della rete, e in minore misura il sistema ufficiale delle notifiche. Invece, il fatto che si sia osservato un aumento parallelo dei casi rilevati dai due sistemi informativi (Figura 11), ci fa ritenere che il *trend* osservato per MAINF sia riferibile non solo al miglioramento della sensibilità di tale sistema informativo, ma anche ad una reale maggiore incidenza dell'infezione invasiva.

Nel 2012 è stata rilevata una riduzione del numero di casi rispetto al 2011: da 75 casi notificati a 45 e da 44 a 27 ceppi inviati al laboratorio, per un totale di casi osservati diminuiti da 93 (tasso di incidenza 0,96 x 100.000 abitanti) a 53 (tasso di incidenza 0,55 x 100.000 abitanti). Quanto questo decremento rappresenti una reale diminuzione

oppure un segnale di perdita di sensibilità del sistema è difficile da definire, ma certamente il fatto che sia stato constatato per entrambe le fonti informative depone a favore di una reale caduta dell'incidenza. L'aumento del numero dei casi osservati nel 2013 (incidenza di 0,83 per 100.000 abitanti) e la lieve riduzione dei casi nel 2014 (incidenza di 0,72 per 100.000) abitanti, ci indirizza a tale ipotesi. Il trend in crescita rilevato nel 2014 per la sorveglianza di laboratorio (LabSS) è riferibile ad una implementazione del sistema volontario di sorveglianza, dovuta ad una efficiente collaborazione tra i laboratori coinvolti nella rete e alla sistematica consultazione del sistema di notifica da parte della sorveglianza LabSS, tale da sollecitare attivamente i laboratori all'invio degli stipiti isolati dai casi notificati.

La differenza nella sensibilità dei due sistemi di sorveglianza (83,3 per MAINF e 49,8% per LabSS) risulta evidente e importante. La spiegazione può essere ricercata nel fatto che, mentre la segnalazione al sistema MAINF deriva da un obbligo di legge e può contare sulla trasmissione della segnalazione per via telematica, l'invio di ceppi al sistema di sorveglianza LabSS è su base volontaria ed è anche influenzato da difficoltà di carattere logistico e pratico. Questo si evidenzia dalla differente partecipazione alla rete da parte dei laboratori più distanti geograficamente dal nostro Centro, come è il caso di Mantova e Sondrio. La sensibile variazione nella risposta delle diverse province indica che esistono margini di miglioramento della sorveglianza LabSS. In particolare è risultato senza dubbio utile il monitoraggio costante degli inserimenti nel database di MAINF per individuare i casi di mancato invio dello stipite di *Lm* da parte dei laboratori ospedalieri, ma sarebbe anche utile individuare modalità di superamento degli ostacoli di carattere "logistico". Si potrebbe ottenere un miglioramento della rete dei laboratori sottolineando l'importanza della collaborazione dei Laboratori delle Aziende Ospedaliere dislocate nelle province meno responsive, e continuando una migliore integrazione delle due fonti consentirebbe al sistema di sorveglianza "ufficiale" di poter usufruire con maggiore efficacia del contributo che il laboratorio può fornire, anche al fine di rilevare cluster o veri eventi epidemici, individuarne la catena di contagio ed ottimizzare gli interventi preventivi [Mamma C. et al, 2013].

La Lombardia è la regione italiana con il maggior tasso di notifica di listeriosi, segnalando mediamente nel 2009 il 40% dei casi riportati a livello nazionale [http://www.salute.gov.it/portale/temi/datidefcons_caricaMalattie.jsp?cod_malatt=0270&classe=02&annoselect=2009&period=00&scelta=opt_regioni®ioni=130]. Calcolando l'incidenza della listeriosi nella Regione e confrontandola con quella nazionale per tutto il

periodo da noi considerato, si può notare come il tasso di incidenza lombardo risulti costantemente superiore rispetto alla media nazionale. Una ipotesi plausibile della differente incidenza della listeriosi nelle varie regioni di Italia può essere ricercata nelle diverse abitudini alimentari, come la tendenza a consumare un pasto principale fuori casa, tipica del Nord Italia, e il ridotto utilizzo di piatti pronti al consumo diffuso invece nelle Regioni del Nord Italia. Tuttavia questi fattori da soli non sono sufficienti a spiegare il basso numero di casi di listeriosi rilevato in queste zone, soprattutto se si considera che i livelli di contaminazione ambientale e alimentare da parte di *Listeria monocytogenes* nelle diverse regioni italiane sono assolutamente analoghi [Gianfranceschi M. V. et al 2009]. È più verosimile che nelle diverse regioni italiane la sottostima dell'incidenza sia riferibile ad una più elevata quota di casi non diagnosticati e non notificati. La nostra indagine ha evidenziato che anche in Lombardia la sorveglianza basata sulla notifica dei casi ha margini di miglioramento, considerando che la rete dei laboratori cattura casinon riportati a MAINF. L'incidenza regionale calcolata sui casi osservati (0,67 x 100.000 abitanti) risulta equiparabile a quella osservata nel 2011 in Paesi come la Svizzera e la Spagna (rispettivamente 0,70 e 0,79 x 100000) (Tabella 18), a noi paragonabili per quanto riguarda le abitudini alimentari.

Per la listeriosi invasiva, diversamente che per altre patologie a trasmissione alimentare, caratterizzate da una sintomatologia gastrointestinale, la probabilità di pervenire alla diagnosi è maggiore richiedendo nel 93% dei casi l'ospedalizzazione [The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012] e i conseguenti accertamenti diagnostici. Il fatto che ci sia una mancata notifica dei casi di listeriosi può essere in parte attribuita a una mancata rilevazione dei casi (under-reporting). Se l'emocoltura o la liquorcoltura sono ormai procedure routinarie in presenza rispettivamente di quadri clinici di carattere setticemico o di infiammazione del SNC, l'accertamento diagnostico risulta meno consolidato nel caso delle forme correlate con la gravidanza, anche in presenza di eventi gravi come la morte fetale. Riteniamo tuttavia che la perdita di casi in quanto "non notificati" sia più importante rispetto ai casi non diagnosticati. È quindi opportuno sollecitare una maggiore attenzione attraverso campagne di sensibilizzazione, rivolte ai clinici e alle direzioni sanitarie degli ospedali che hanno per legge il dovere di segnalare i casi.

Tabella 18: andamento MTA ad eziologia batterica in Europa e in una selezione di Paesi europei [The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011]

Paesi Europei	N° casi	Incidenza
Italia	83	0,14
Francia	282	0,43
Germana	330	0,40
Spagna	91	0,79
UK	164	0,25
Danimarca	49	0,88
Polonia	62	0,16
Grecia	9	0,08
Totale UE	1476	0,32

Un altro aspetto interessante è quello della diversa incidenza della listeriosi nelle differenti province lombarde: i maggiori tassi di incidenza calcolati sui casi osservati, sono stati osservati a Sondrio (1,11 x 100.000 abitanti), Bergamo (1,02 x 100.000 abitanti), e Lecco (1,00 x 100.000 abitanti), province tra di loro limitrofe. L'elevata incidenza della listeriosi in queste tre province può essere interpretata sulla base dell'importante sviluppo di produzioni artigianali (da latte crudo) che si riscontra in quelle zone, in quanto il latte, soprattutto se non è pastorizzato, e tutti i suoi derivati, in particolare formaggi a pasta molle (taleggio), rappresentano una delle tipologie di alimenti maggiormente a rischio di contaminazione da parte di *Lm*.

5.2 Caratteristiche microbiologiche ed epidemiologia molecolare

Per quanto concerne i risultati della sierotipia, i nostri dati concordano con quelli della letteratura [C. Mammina et al, 2013] confermando la maggiore frequenza dei sierotipi 1/2a e 4b per i casi di listeriosi invasiva. Il sierotipo più comune è stato l'1/2a, che infatti sta soppiantando anche su scala nazionale il 4b come sierotipo prevalentemente implicato nelle infezioni umane, a conferma di quanto già osservato nella nostra regione da Pontello et al (2012). Non è tuttavia mancato il riscontro di sierotipi meno frequenti (1/2b e 1/2c) che sono stati segnalati in casi clinici anche in passato [Mammina C. et al, 2013; Bille J., 2005; Lyytikäinen O., 2006]. A causa del suo scarso potere discriminante, questa tecnica di tipizzazione intraspecifica ha fornito limitati contributi allo studio

epidemiologico dei casi di listeriosi. Più interessanti al fine di riconoscere collegamenti tra casi ed eventuali eventi epidemici sono i risultati ottenuti con la tipizzazione genotipica. Infatti, mentre con la sierotipia è stato possibile individuare solo 4 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) di *L. monocytogenes* la MLST ha classificato i 289 isolati in 52 STs.

Complessivamente abbiamo evidenziato 6 STpredominanti durante il periodo oggetto dello studio (2006-2014), tra questi il ST155 per la sua distribuzione spazio-temporale risulta emergere negli ultimi anni rispetto i restanti 5 STs già riportati nella stessa area geografica [Mammina et al., 2013].

Dal punto di vista clinico considerando i 6 principali STs, non si riscontra una maggiore associazione tra i casi legati alla gravidanza ed uno dei due predominanti sierotipi (1/2a e 4b), mentre nessun caso legato alla gravidanza viene riportato per il ST3 appartenente ad sierotipo più raro (1/2b), ipotizzando ad una minore aggressività di questo ceppo non trascurando che si tratta di una casistica ristretta. La più alta percentuale (18,2%) di casi legati alla gravidanza viene riportata per il ST155 in una ristretta finestra spazio-temporale, che suggerisce una possibile correlazione tra i 4 casi sebbene le inchieste epidemiologiche effettuate non lo abbiano potuto confermare.

Il ST3 risulta colpire in minor misura i soggetti di età superiore ai 70 anni (35,5%), anche se contestualmente presenta il maggior numero di casi con condizioni predisponenti, quindi legata ad altri fattori di rischio. La patologia concordemente ai dati di letteratura si manifesta principalmente con forme setticemiche ed in minor misura con meningiti. Infine il ST2 presenta rispetto ai restanti 5 STs una letalità maggiore (54,5%) considerando anche la variabile sulle condizioni predisponenti, facendo ipotizzare ad una maggiore invasività di questo ceppo appartenente al sierotipo 4b.

Analizzando l'incidenza per i 6 principali STs e comparandoli con i dati derivanti dal sistema di sorveglianza integrato (MAINF e LabSS) si rileva un dato discorde per la provincia di Sondrio, la quale presenta la maggiore incidenza per provincia in Lombardia (1,11 per 100.000 abitanti) ma non viene coinvolta nella distribuzione spazio-temporale dei casi appartenenti ai principali STs riscontrati in tutto il periodo di studio. Questa discrepanza dei dati risulta essere concorde anche con le analisi dei due sistemi di sorveglianza, in cui la rete basata sui laboratori è influenzata da difficoltà di carattere logistico e pratico per i laboratori più distanti dal nostro Centro.

I 6 STs possono essere distinti in due gruppi sulla base della distribuzione spazio-temporale. Il primo gruppo (ST1, ST2 e ST3) è caratterizzato da un andamento dei casi

che fa supporre ad una persistenza di questi genotipi nell'area lombarda (probabilmente molto adattati nelle filiere e presenti anche in altre aree geografiche) ma senza l'evidenza di particolari eventi epidemici. Per il secondo gruppo (ST8, ST38 e ST155), invece, si evidenzia un andamento dei casi che fa supporre l'insorgenza di outbreak non riconosciuti dalle autorità sanitarie in Regione Lombardia. Tali ipotesi vengono rafforzate se si considerano i dati provenienti dal database Pasteur MLST, in cui vengono rilevati un totale di 793 casi per gli ST appartenenti al primo gruppo e soltanto 112 casi totali per gli STs appartenenti al secondo gruppo. Una ulteriore conferma deriva dall'analisi statistica effettuata sul ST38 in collaborazione con il Dipartimento di Matematica – Università degli Studi di Milano (Matuonto I, Aletti G and Pontello M., A statistical method for identification of epidemics in rare diseases: a cluster of listeriosis cases. Epidemics - 4th International conference 19-22 November 2013, Amsterdam) in cui si applica il test adattivo sull'omogeneità del processo di Poisson per descrivere la distribuzione dei casi di listeriosi nel tempo. L'analisi statistica confuta l'ipotesi nulla che i campioni siano distribuiti nello spazio e nel tempo in modo omogeneo, dimostrando che nel 2010 nella provincia di Bergamo la distribuzione dei casi non è stata casuale e che, quindi, ci sia stata evidentemente un incremento significativo del numero dei casi dovuti ad ST38. L'aver individuato dei *clusters* con un'estensione temporale protratta nel tempo conferma la tendenza di *Lm* a contaminare in maniera persistente le filiere alimentari. In questo modo diversi lotti della stessa produzione possono essere veicolo dell'infezione anche a distanza di anni e i casi di malattia possono insorgere in periodi di tempo molto ampi. Il rilevamento dei veicoli di contaminazione, assieme all'individuazione tempestiva degli alimenti coinvolti negli *outbreaks*, sono essenziali per inattivare la via di trasmissione del patogeno. A questo scopo la collaborazione con le autorità preposte al controllo alimentare, che effettuano la tipizzazione genetica dei ceppi di *Lm* isolati dagli animali, dai prodotti alimentari e dagli ambienti di produzione alimentare, permette di verificare analogie e differenze nella distribuzione dei genotipi, potenziando l'attività di sorveglianza e la prevenzione dell'infezione [MGianfranceschi et al. V., 2009; Mammina C. et al, 2009].

5.3 Modelli applicati in epidemiologia molecolare

L'analisi effettuata attraverso la MVLST di tutti gli isolati appartenenti al ST38 ha rilevato che appartengono a due VTs che si differenziano per un *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) in posizione 90 del gene di virulenza *dal*. Questa mutazione risulta essere di tipo missenso non neutra, in cui viene sostituita l'istidina (aa basico) con una tirosina (aa idrofilo aromatico) e conseguentemente potrebbe avere un effetto positivo nella selezione di questo VT o un cambiamento nelle caratteristiche di virulenza nel ceppo. Analizzando la distribuzione spazio-temporale della scomposizione del ST38 nei due VTs, notiamo come l'analisi MVLST fornisce dei dati con una maggiore concordanza epidemiologica. Infatti, gli isolati VT104 vengono meglio definiti dal punto di vista temporale (2009-2011) e spaziale (Centro-Est). La ragione per cui entrambi i VTs (80 e 104) appartengono allo stesso ST (ST38) è probabilmente dovuta al fatto che i geni *housekeeping* sono transitati "hitchhike" [Smith, 1993] dal VT80 al VT104, altamente adattato ed emergente.

L'analisi delle indagini epidemiologiche dei 13 casi hanno rilevato una forte associazione con la categoria alimentare dei formaggi, in cui per alcuni casi viene specificata anche la tipologia (taleggio, formaggi molli e freschi). Inoltre, per un caso clinico è stato possibile confermare dal punto di vista molecolare l'associazione con l'alimento coinvolto, nello specifico di un particolare tipo di formaggio a pasta molle di origine lombarda chiamato taleggio. La conferma è stata effettuata attraverso due metodiche di *fingerprinting*, PFGE e *ribotyping*. Infine i ceppi alimentari sono stati sottoposti ad analisi MVLST ed anche in questo viene confermata l'associazione con l'alimento, i cui uno dei tre isolati alimentari appartiene al VT104. Sebbene il CDC definisca un *foodborne-disease outbreak (FBDO)* come due o più persone che manifestano una malattia simile derivante dall'ingestione di un alimento comune, la stretta correlazione molecolare degli isolati e l'analisi delle inchieste epidemiologiche possono essere sufficienti per sostenere che i casi siano tra loro collegati dal consumo dello stesso alimento. Per cui possiamo affermare che il ceppo ST38/VT104 è responsabile del più grande *foodborne-disease outbreak* riportato in Italia ad oggi. Inoltre la conferma che anche gli isolati alimentari appartengono al VT104, ci permette di definire questo evento epidemico come il primo *Outbreak Clone* riportato in Italia ad oggi.

6 CONCLUSIONI

Le indagini epidemiologiche sui casi di listeriosi risultano spesso molto complesse a causa di una serie di fattori legati alla ecologia di *Lm* e alle caratteristiche della catena di contagio e della popolazione a rischio: da una parte l'ampia diffusione e persistenza ambientale del microrganismo e la possibile contaminazione di prodotti alimentari caratterizzati da una lunga *shelf-life*, e dall'altra il lungo periodo d'incubazione e il fatto che, a parità di esposizione al consumo alimentare, solo una piccola quota di soggetti, appartenenti alle categorie a rischio, manifesti i sintomi della grave infezione invasiva. Tutti questi aspetti, che hanno fatto della listeriosi una malattia atipica rispetto alle altre più comuni patologie a trasmissione alimentare, contribuiscono a una dispersione temporale e spaziale dei casi, e pongono gravi difficoltà all'identificazione delle correlazioni epidemiologiche e alla ricostruzione delle vie di trasmissione. L'adozione di metodi di subtipizzazione rappresenta un insostituibile strumento [Mammìna C. et al, 2009; Cartwright E. J. et al, 2013] per supportare la sorveglianza basata sulla segnalazione dei casi attraverso la notifica. L'integrazione delle informazioni raccolte dai due sistemi di sorveglianza attivi in Lombardia è risultata utile per definire il quadro epidemiologico della listeriosi e individuare sospette associazioni tra casi. Ci sono margini di miglioramento nella sensibilità di entrambe le reti informative ed anche in termini di tempestività e sistematicità dello scambio di informazioni tra i due sistemi, così da favorire un più adeguato svolgimento delle inchieste epidemiologiche ed una più efficace attività di prevenzione. L'epidemiologia molecolare risulta essere uno strumento utile e di supporto alla epidemiologia convenzionale, in particolare per la listeriosi risulta avere un ruolo decisivo considerando le modalità di trasmissione e le caratteristiche peculiari del patogeno nel riconoscimento dei *foodborne-disease outbreaks*. Basandoci sul nuovo modello della struttura epidemica della popolazione, ciò che si dissemina nel tempo e nello spazio è un clone epidemico definito dai suoi geni di virulenza (VT) e non un *Clonal Complex* definito dai geni *housekeeping* (ST). Il ST38 appartenente al CC101 è comune sia al VT80 che al VT104, probabilmente poiché il ST transita "hitchhike" sul VT o EC emergente e successivamente si dissemina ampiamente nel tempo e nello spazio. In prospettiva delle ricerche future, sebbene ad oggi la PFGE rappresenta la tecnica *gold standard* (Ruppitsh et al., 2015), risulta interessante la possibilità di determinare il VT per tutti i gli isolati di questo studio, in modo da poter valutare meglio le dinamiche di trasmissione, il potere discriminante e la concordanza epidemiologica di

queste tecniche molecolari al fine di avere una visione più completa. Quindi ogni conclusione basata su questi dati deve essere fatta con estrema cura. È evidente che molte tecniche molecolari (PFGE, MLST, MVLST...) sono state sviluppate prima dell'emergere delle tecnologie di *next-generation high-throughput genome sequencing*. Questi metodi hanno alcune limitazioni comuni, come l'incompleta rilevazione di variazioni genomiche che esistono tra diversi ceppi che causano eventi epidemici. Le tecnologie di *Whole-Genome Sequencing* (WGS) forniscono ovvi vantaggi per la sub-tipizzazione di batteri patogeni con la capacità di valutare le caratteristiche delle sequenze su l'intero genoma batterico [Oyarzabal O.A. and Kathariou S, 2014, Kwong J.C. et al., 2015].

BIBLIOGRAFIA

Adzitey F. and Huda N., *Listeria monocytogenes in foods: incidence and possible control measures*, African Journal of Microbiology Research, 2010; 2848-2855.

Allerberger F., Wagner M., *Listeriosis: a resurgent foodborne infection*, Clin Microbiol Infect, 2010; 16-23.

Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, Nakayama K, Hayashi T., The defective prophage pool of Escherichia coli O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants, PLoS Pathog. 2009 May;5(5):e1000408. doi: 10.1371/journal.ppat.1000408. Epub 2009 May 1.

Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turk M., *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*, American Society for Clinical Pathology, 1996; 493-496.

Beaglehole R., Bonita R., Kjellstrom, *Epidemiologia di base*, Editoriale Fernando Folini, 1993.

Belœil P. A., Fravalo P., Chauvin C., Fablet C., Salvat G., Madec F., *Listeria spp. contamination in piggeries: comparison of three sites of environmental swabbing for detection and risk factor hypothesis*, J. Vet. Med., 2003; 155-160.

Bertsch D., Rau J., Eugster M. R., Haug M. C., Lawson P. A., Lacroix C., Meile L., *Listeria fleischmannii sp. nov., isolated from cheese*, Int J Syst Evol Microbiol, 2013.

Bille J, Blanc DS, Schmid H, Boubaker K, Baumgartner A, Siegrist HH, Tritten ML, Lienhard R, Berner D, Anderau R, Treboux M, Ducommun JM, Malinverni R, Genné D, Erard PH, Waespi U, Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Euro Surveill* 2006, 11:91–93.

Beuchat L. R.; *Listeria monocytogenes: incidence on vegetables*, Food Control, 1996.; Vol. 7, No. 4/5; 223-228.

Boerlin P, Rocourt J, Piffaretti JC, Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis, *Int J Syst Bacteriol.* 1991 Jan;41(1):59-64.

Bortolussi R., *Listeriosis: a primer*, Canadian Medical Association, 2008; 795-797.

Brackett R. E., *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in products of plant origin*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 631-655.

Buchholz U., Mascola L., *Transmission, pathogenesis and epidemiology of Listeria monocytogenes*, *Infectious Diseases in clinical practice*, 2001; 34-41.

Bunic S., Avery S. M., *Microbiological safety of meat | Listeria monocytogenes*, in Devine C, Dikeman M. (a cura di), *Encyclopedia of meat sciences*, 2004; 804-814.

Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Diancourt L, Frezal L, Leclercq A, Wirth T, Lecuit M, Brisse S., "Epidemic clones" of *Listeria monocytogenes* are widespread and ancient clonal groups, *J Clin Microbiol.* 2013 Nov;51(11):3770-9. doi: 10.1128/JCM.01874-13. Epub 2013 Sep 4.

Carminati D., Perrone A., Giraffa G., Neviani E., Mucchetti G., *Characterization of Listeria monocytogenes strains isolated from Gorgonzola cheese rinds*, *Food microbiology*, 2004; 801-807.

Cartwright E. J., Jackson K. A., Johnson S. D., Graves L. M., Silk B. J., Mahon B. E., *Listeriosis outbreaks associated food vehicles, United states, 1998-2008*, *Emerging Infectious Diseases*, 2013; Vol. 19, No. 1; 1-8.

Cetin M. S., Zhang C., Hutkins R. W., Abenson. K., *Regulation of Transcription of Compatible Solute Transporters by the General Stress Sigma Factor, σ^B , in Listeria monocytogenes*, *Journal of bacteriology*, 2004; Vol. 186, No. 3: 794-802.

Chan Y. C., Wiedmann M. *Physiology and Genetics of Listeria Monocytogenes Survival and Growth at Cold Temperatures*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2009; 49:237–253.

Chen Y, Knabel SJ., Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeriamonocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*, *mAppl Environ Microbiol.* 2007 Oct;73(19):6299-304. Epub 2007 Aug 10.

Chen Y, Knabel SJ., Prophages in *Listeria monocytogenes* contain single-nucleotide polymorphisms that differentiate outbreak clones within epidemic clones, *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1478-84. doi: 10.1128/JCM.01873-07. Epub 2008 Feb 6.

Charpentier E., Courvalin P., *Antibiotic resistance in Listeria spp.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999; 2103-2108.

Chaturongakul S., Raengpradub S., Wiedmann M., Boor K. J., *Modulation of stress and virulence in Listeria monocytogenes*, *Trends Microbiol*, 2008; 16 (8): 388–396.

Chen Y, Zhang W, Knabel SJ., *Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of Listeria monocytogenes*, *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):835-46. Epub 2007 Jan 10. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;50(11):3818;

Conter M., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Ianieri A., *Characterization of antimicrobial resistance of foodborne Listeria monocytogenes*, *International Journal of food microbiology*, 2008; 497-500.

Cossart P., Bierne H., *The use of host cell machinery in the pathogenesis of Listeria monocytogenes*, *Current opinion in immunology*, 2001; 13: 96-103.

Cox N. A., Bailey J. S., *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in poultry and egg products*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 565-600.

De Castro V., Escudero J. M., Rodriguez J. L., Muniozguren N., Uribarri J., Saez D., Vazquez J., *Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012*, *Eurosurveillance*, 2012; Vol. 17, Issue 42.

De Las Heras A., Cain R. J., Bielecka M. K., Vazquez Boland J. A., *Regulation of Listeria virulence: PrfA master and commander*, *Current opinion in Microbiology*, 2011; 14: 118-127.

den Bakker HC, Bundrant BN, Fortes ED, Orsi RH, Wiedmann M., A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*, *Appl Environ Microbiol.* 2010 Sep;76(18):6085-100. doi: 10.1128/AEM.00447-10. Epub 2010 Jul 23.

Doganay M., *Listeriosis: clinical presentation*, *Immunology and Medical Microbiology*, 2003; 173-175.

Dongyou Liu, *Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborn pathogen*, *Journal of medical Microbiology*, 2005; 645-659.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1008-15.

Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, de Romans S, Lim C, Roux C, Passet V, Diancourt L, Guibourdenche M, Issenhuth-Jeanjean S, Achtman M, Brisse S, Sola C, Weill FX, CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of Salmonella infections, *PLoS One.* 2012;7(5):e36995. doi: 10.1371/journal.pone.0036995. Epub 2012 May 18.

Farber J. M., Peterkin P. I., *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in meat products*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 505-564.

Farber J. M., Peterkin P. I., *Listeria monocytogenes a Food born Pathogen* *Microbiological Reviews*, 1991; Vol. 55, No. 3: 476-511.

Farber J. M., Ross W. H., Harwig J., *Health risk assessment of Listeria monocytogenes in Canada*, *International Journal of Food Microbiology*, 1996; 145-156.

Feil E.J., Enright M.C., *Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens*, *Curr Opin Microbiol.* 2004 Jun;7(3):308-13.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG., eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data, *J Bacteriol.* 2004 Mar;186(5):1518-30.

Fenlon D. R., *Listeria monocytogenes in the natural environment*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 2: 21-37.

Fonti dati epidemiologici e misure utilizzate in epidemiologia, in J. F. Jekel, D. L. Katz, J. G. Elmore, *Epidemiologia, biostatistica e medicina preventiva*, 2^a edizione, 2: 22-52.

Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF., Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies, *Epidemiol Perspect Innov.* 2005 Nov 25;2:10.

Freitag N. E., Port G. C., Miner M. D., *Listeria monocytogenes – from saprophyte to intracellular pathogen*, *Nat Rev Microbiol*, 2009.

Fretz R, Pichler J., Sagel U., Much P., Ruppitsch W., Pietzka A. T., Stöger A., Huhulescu S., Heuberger S., Appl G., Werber D., Stark K., Prager R., Flieger A., Karpíšková R., Pfaff G., Allerberger F., *Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different L. monocytogenes serotype 1/2a strains, 2009-2010*, *Eurosurveillance*, 2010; Vol.15, Issue 16.

Gallo U., Bano F., Cocchio M., Carniel L., Cesaro K., Giron M. C., Meneghetti F., Salomoni M., Donato D., Grion A. M., *Stima della prevalenza della popolazione portatrice di patologie croniche mediante il metodo cattura e ricattura: l'esempio del diabete mellito*, *Giornale Italiano di Farmacia Clinica*, 2005.

Gandhi M., Chikindas M. L., *Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive*, *Int J of Food Microbiology*, 2007; 113: 1-15.

Geidraitienė A., Vitkauskienė A., Naginienė R., Pavilionis A., *Antibiotic resistance Mechanisms of clinically important bacteria*, *Medicina (Kaunas)*, 2011; 47: 137-146.

Gerner-Smidt P., Ethelberg S., Schiellerup P., Christensen J. J., Engberg J., Fussing V., Jensen A., Jensen C., Petersen A. M., Bruun B. G., *Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality*, *Clinical microbiology and Infection Disease*, 2005; 678-624.

Gianfranceschi MV, Gattuso A, D'Ottavio MC, Fokas S, Aureli P: Results of a 12-month long enhanced surveillance of listeriosis in Italy. *Euro Surveill* 2007, 12:E7-E8.

Gianfranceschi M. V., D'Ottavio M. C., Gattuso A., Bella A., Aureli P., *Distribution of serotypes and Pulsotypes of L.monocytogenes from human, food, and environmental isolates (Italy 2002-2005)*, Food Microbiology, 2009.

Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, de Lencastre H., Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*., *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):366-79.

Goulet V., Hedberg C., Le Monnier A., De Valk H., *Increasing Incidence of listeriosis in France and other European countries*, *Emerging Infectious Diseases*, 2008; Vol. 14, No. 5, 734-740.

Goulet V., Herbert M., Hedberg C., Laurent E., Vaillant V., Valk H. De, Desenclos J. C.; *Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis*, *Clinical Infectious Diseases*, 2012; 652-660.

Gravani R., *Incidence and control of Listeria in food-processing facilities*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 657-709.

Graves LM, Hunter SB, Ong AR, Schoonmaker-Bopp D, Hise K, Kornstein L, DeWitt WE, Hayes PS, Dunne E, Mead P, Swaminathan B., Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet network, *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2350-5.

Graves L. M., Swaminathan B., Hunter S. B., *Subtyping Listeria monocytogenes*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 3rd edition, 2007; 283-299.

Gray M. C., Freitag N. E., Boor K. J., *How the bacterial pathogen Listeria monocytogenes mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde*, *Infection and Immunity*, 2006, Vol. 74, No. 5; 2505-2512.

Guevara R. E., Mascola L., Sorvillo F., *Risk factor for Mortality among patients with nonperinatal listeriosis in Los Angeles County, 1992-2004*, *Clinical Infectious Diseases*, 2009; 1507-1515.

Hächler H., Marti G., Giannini P., Lehner A., Jost M., Beck J., Weiss F., Bally B., Jermini M., Stephan R., Baumgartner A., *Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011*, *Eurosurveillance* 2013, Vol. 18, Issue 18.

Hächler H., Marti G., Giannini P., Lehner A., Jost M., Beck J., Weiss F., Bally B., Jermini M., Stephan R., Baumgartner A., *Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011*, *Surveillance and outbreak reports*; 2012.

Hansen J. M., Gerner-Smidt P., Bruun B., *Antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes in Denmark 1958–2001*, *APMIS* 2005; 31–36.

Hedberg C., *Listeria in Europe: the need for a European surveillance network is growing*, *Eurosurveillance*, 2006; Vol. 11, 75-76.

Ho A. J., Ivanek R., Gröhn Y. T., Nightingale K. K., Wiedmann M., *Listeria monocytogenes fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific L. monocytogenes subtypes*, *Preventive Veterinary Medicine*, 2007; 287-305.

Hof H., *Listeria monocytogenes: a causative agent of gastroenteritis?*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001; 369–373.

Hook E. B., Regal R., *Capture-Recapture method in epidemiology: methods and limitations*, *Epidemiologic Reviews*, 1995; Vol. 17, No. 2.

International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting, *Capture and multiple Record System Estimation I: History and Theoretical Development*, *American Journal of Epidemiology*, 1995; Vol 142, No. 10.

Ivanek R., Gröhn Y. T., Wiedmann M., *Listeria monocytogenes in multiple habitats and host population: review of available data for mathematical modeling*, *Foodborne pathogens and disease*, 2006; Vol. 3, No 4: 319-336.

Jackson K. A., Iwamoto M., Swerdlow D., *Pregnancy - associated listeriosis*, Epidemiol. Infect., 2010, 1503-1509.

Jadhav S., Bhave M., Palombo E. A., *Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes*, Journal of Microbiological Methods, 2012; 327-341.

Jamieson D. J., Theiler R. N., Rasmussen S. A., *Emerging infections and pregnancy*, Emerging infectious diseases; Vol. 12, No. 11, 2006.

Jemmi T., Stephan R., *Listeria monocytogenes: food-borne pathogen and hygiene indicator*, Revue scientifique et technique (International Office of Epizootic), 2006; 571-580.

Jinneman K. C., Wekell M. M., Eklund M. W., *Incidence and behavior of listeria in fish and seafood*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), Listeria, Listeriosis, and food safety, 2nd edition; 601-630.

Johnston A. M., *Use of antimicrobial drugs in veterinary practice*, BMJ, 1998.

Juhas M, Crook DW, Dimopoulou ID, Lunter G, Harding RM, Ferguson DJ, Hood DW., Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands, J Bacteriol. 2007 Feb;189(3):761-71. Epub 2006 Nov 22.

Kanakiraman V., *Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment and prevention*, Reviews in Obstetrics and Gynecology, 2008; Vol. 1, No. 4; 179-185.

Knabel SJ, Reimer A, Verghese B, Lok M, Ziegler J, Farber J, Pagotto F, Graham M, Nadon CA, *Sequence typing confirms that a predominant Listeria monocytogenes clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010*, Canadian Public Health Laboratory Network (CPHLN), Gilmour MW. J Clin Microbiol. 2012 May;50(5):1748-51. doi: 10.1128/JCM.06185-11. Epub 2012 Feb 15.

Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Stine OC., *Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among Yersinia species*, J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2674-84.

Kovačević J., Mesak L. R., Allen K. J., *Occurrence and characterization of Listeria spp. In ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia*, Food Microbiology, 2012; 372-378.

Kwong JC, Mercoulia K, Tomita T, Easton M, Li HY, Bulach DM, Stinear TP, Seemann T, Howden BP., *Prospective whole genome sequencing enhances national surveillance of Listeriamonocytogenes*, J Clin Microbiol. 2015 Nov 25. pii: JCM.02344-15.

Lambertz S. T., Nilsson C., Bradenmark A., Sylven S., Johansson A., Jansson L. M., Lindblad M., *Prevalence and level of Listeria monocytogenes in ready to eat foods in Sweden 2010*, International Journal of Food Microbiology, 2012; 24-31.

Lamont R. F., Sobel J., Mazaki-Tovi S., Kusanovic J. P., Vaisbuch E., Kim S. K., Uldbjerg N., Romero R., *Listeriosis in Human pregnancy: a systematic review*, J. Perinat Med, 2011; 227-236.

Lang Halter E., Neuhaus K., Scherer S., *Listeria weihenstephanensis sp. nov., isolated from the water plant Lemna trisulca taken from a freshwater pond*, Int. J Syst Evol Microbiol, 2013.

Lemée L, Bourgeois I, Ruffin E, Collignon A, Lemeland JF, Pons JL, *Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of Clostridium difficile*, Microbiology. 2005 Oct;151(Pt 10):3171-80.

Lianou A., Sofos J. N., *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, Vol. 70, No. 9; 2172-2198.

Liu Y, Ream A, Joerger RD, Liu J, Wang Y., *Gene expression profiling of a pressure-tolerant Listeria monocytogenes Scott A ctsR deletion mutant*, J Ind Microbiol Biotechnol. 2011 Sep;38(9):1523-33. doi: 10.1007/s10295-011-0940-9. Epub 2011 Feb 5.

Lyytikäinen O, Nakari UM, Lukinmaa S, Kela E, Nguyen Tran Minh N, Siitonen A: *Surveillance of listeriosis in Finland during 1995–2004. Euro Surveill* 2006, 11:82–85.

Lomonaco S, Chen Y, Knabel SJ., Analysis of additional virulence genes and virulence gene regions in *Listeria monocytogenes* confirms the epidemiologic relevance of multi-virulence-locus sequence typing, *J Food Prot.* 2008 Dec;71(12):2559-66.

Lomonaco S., Decastelli L., Nucera D., Gallina S., Bianchi D. M., Civera T., *Listeria monocytogenes* in *Gorgonzola*: Subtypes, diversity and persistence over time, *International Journal of Food Microbiology*, 2009; 516-520.

Lomonaco S., Verghese B., Gerner-Smidt P., Tarr C., Gladney L., Joseph L., Katz L., Turnsek M., Frace M., Chen Y., Brown E., Meinersmann R., Berrang M., Knabel S., *Novel Epidemic clones of Listeria monocytogenes in United States, 2011*, *Emerging Infectious Disease*, 2013, Vol. 19, No. 1; 147-150.

Lund B. M., O'Brien S. J., *The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people*, *Foodborne Pathogens and disease*, 2011; Vol. 8, No. 9, 961-973.

Mac Donald L. E., Brett J., Kelton D., Majowicz S. E., Snedeker K., Sargeant J. M., *A Systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins and evidence for raw milk consumption and other health related outcomes*, *Journal of Food Protection*, 2011; Vol. 74, No. 11; 1814–1832.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG, *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):3140-5.

Mammina C., Parisi A., Guaita A., Aleo A., Bonura C., Nastasi A., Pontello M., *Enhanced surveillance of invasive listeriosis in the Lombardy region, Italy, in the years 2006-2010 reveals major clones and an increase in serotype 1/2a*, *BMC Infectious Disease*, 2013.

Maertens de Noordhout C, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014;14: 1073–1082.

Meinersmann RJ, Phillips RW, Wiedmann M, Berrang ME., *Multilocus sequence typing of Listeria monocytogenes by use of hypervariable genes reveals clonal and*

recombination histories of three lineages, *Appl Environ Microbiol.* 2004 Apr;70(4):2193-203.

Milillo S. R., Friedly E. C., Saldivar J. C., Muthaiyan A., O'Brian C., Crandall P. G., Johnson M. G., Ricke S. C., *A review of the Ecology, Genomics and stress response of Listeria innocua and Listeria monocytogenes*, *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 2012; 712-725.

Mohammed H. O., Atwill E., Dunbar L., Ward T., McDonough P., Gonzalez R., Stipetic K., *The risk of Listeria monocytogenes infection in beef cattle operations*, *Journal of Applied Microbiology*, 2009; 1-8.

Morvan A., Moubareck C., leclercq A., Hervé-Bazin M., Bremont S., Lecuit M., Cpurvalin P., Le monnier A., *Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes strains isolated from humans in France*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010; Vol. 54, No. 6; 2728-2731.

Muñoz P., Rojas L., Bunsow E., Saez E., Sánchez-Cambronero L., Alcalá L., Rodríguez-Creixems M., Bouza E., *Listeriosis: an emerging public health problem especially among the elderly*, *Journal of Infection*, 2012; 19-33.

Newell D. G., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threlfall J., Scheutz F., van der Geissen J., Kruse H., *Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist in new ones continue to emerge*, *International Journal of Food Microbiology*, 2010; S3-S15.

Nightingale K. K., Schukken Y. H., Nightingale C. R., Fortes E. D., Ho A. J., Her Z., Grohn Y. T., McDonough P. L., Wiedmann M., *Ecology and transmission of Listeria monocytogenes infecting ruminants and in the farm environment*, *Applied and environmental microbiology*, 2004; Vol. 70, No. 8; 4458-4467.

Ochman H, Bergthorsson U., *Rates and patterns of chromosome evolution in enteric bacteria*, *Curr Opin Microbiol.* 1998 Oct;1(5):580-3. Review.

Olsen SJ, Patrick M, Hunter SB, Reddy V, Kornstein L, MacKenzie WR, Lane K, Bidol S, Stoltman GA, Frye DM, Lee I, Hurd S, Jones TF, LaPorte TN, Dewitt W, Graves L, Wiedmann M, Schoonmaker-Bopp DJ, Huang AJ, Vincent C, Bugenhagen A, Corby J,

Carlioni ER, Holcomb ME, Woron RF, Zansky SM, Dowdle G, Smith F, Ahrabi-Fard S, Ong AR, Tucker N, Hynes NA, Mead P., Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat, *Clin Infect Dis*. 2005 Apr 1;40(7):962-7. Epub 2005 Mar 3.

Ooi S. T., Lorber B., *Gastroenteritis due to Listeria monocytogenes*, *Clinical Infectious Diseases*, 2005; 1327-32.

Orsi R., den Bakker H. C., Widwmann M., *Listeria monocytogenes lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics* *Int J Med Microbiol*, 2011; 301: 79-96.

Oyarzabal O.A., Kathariou S.(Editor), *DNA Methods in Food Safety: Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens*, ISBN: 978-1-118-27867-3, October 2014, Wiley-Blackwell.

Pamer E. G., *Immune responses to Listeria monocytogenes*, *Nature Review | Immunology*, 2004; 812-823.

Pérez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP, Crandall KA, Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data, *Infect Genet Evol*. 2006 Mar;6(2):97-112. Epub 2005 Mar 24.

Pintado C. M. B. S., Oliveira A., Pampulha M. E., Ferreira M. A. S. S., *Prevalence and characterization of Listeria monocytogenes isolated from soft cheese*, *Food Microbiology*, 2005; 79-85.

Ponniah J., Robin T., Paie M. S., Radu S., Ghazali, F. M., Kqueen C. Y., Nishibuchi M., Nakaguchi Y., Malakar P. K., *Listeria monocytogenes in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia*, *Food Control*, 2010; 774-778.

Pontello M., Guaita A., Sala G., Cipolla M., Gattuso A., Sonnessa M., Gianfranceschi M. V., *Listeria monocytogenes serotypes in human infections (Italy, 2000-2010)*, *Ann Ist Super Sanità*, 2012; Vol. 48, No. 2; 146-150.

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 Sep 5;4(9):e1000146. doi: 10.1371/journal.ppat.1000146.

Ramaswamy V., Crescence V. M., Rejith J. S., Lekshmi M. U., Dharsana K. S., Prasad S. P., Vijila H. M., *Listeria – review of epidemiology and pathogenesis* Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2007; 4-13.

Rice L. B., Bonomo R. A., *Mechanism of resistance to antibacterial agents*, in J. Versalovic, K. C. Carroll, G. Funke, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, D. W. Tenover, D. Tenover (a cura di), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edition, 2011; 66; 1082–1114.

Roberts A. J., Wiedmann M., *Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2003; 904-918.

Roberts A. J., Wiedmann M., *Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis*, Cellular and Molecular Life Sciences, 2003.

Rocourt J., *Risk factors for listeriosis*, Food Control, Vol. 7, 1996; No. 4/5; 195-202.

Rocourt J., Jacquet Ch., Reilly A., *Epidemiology of human listeriosis and seafoods*, International Journal of Food Microbiology, 2000; 197-209.

Rørvik L. M., Caugant D. A., Yndestad M., *Contamination pattern of Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant*, International Journal of Food Microbiology, 1995; 19-27.

Rudolf M., Scherer S., *High incidence of Listeria monocytogenes in european red smear cheese*, International Journal of Food Microbiology, 2001; 91-98.

Ruppitsch W, Prager R, Halbedel S, Hyden P, Pietzka A, Huhulescu S, Lohr D, Schönberger K, Aichinger E, Hauri A, Stark K, Vygen S, Tietze E, Allerberger F, Wilking H., *Ongoing outbreak of invasive listeriosis, Germany, 2012 to 2015*, Euro Surveill. 2015 Dec 17;20(50). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30094.

Ryser E. T., *Foodborne listeriosis*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 299-358.

Ryser E. T., *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in unfermented dairy products*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition 199; 359-409.

Ryser E. T., *Listeria monocytogenes*, in H. Roginski (a cura), *Encyclopedia of Dairy Science*, 2002; 1650–1655.

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 Feb;41(2):757-62.

Schnupf P., Portnoy D. A., *Lisreiolysin O: a phagosome specific lysin*, *Microbes and infection*; 2007; 9: 1176-1187.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS., *Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematic*, *Appl Environ Microbiol.* 1986 May;51(5):873-84.

Seveau S., Pizarro-Cerda J., Cossart P., *Molecular mechanisms exploited by listeria monocytogenes during host cell invasion*, *Microbes and Infection*, 2007; 9: 1167-1175.

Silk B. J., Date K. A.; Jackson K. A., Pouillot R., Holt K. G., Graves L. M., Ong K. L., Hurd S., Meyer R., Marcus R., Shiferaw B., Norton D. M., Medus C., Zansky S. M., Cronquist A. B., Henao O. L., Jones T. F., Vugia D. J., Farley M. M., Mahon B. E., *Invasive listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009; further targeted prevention needed for higher-risk groups*, *Clinical Infectious Diseases*, 2012; S396-S404.

Sleator R. D., Watson D., Hill C., Gahan C. G., *The interaction between Listeria monocytogenes and the host gastrointestinal tract*, *Microbiology*, 2009; 2463-2475.

Sleator R. D., Wemekamp-Kamphuis H. H., Gahan C. G. M., Abee T., Hill C., *A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in Listeria monocytogenes*, *Molecular Microbiology* 2005; 1183-1195.

Slutesker L., Schuchat A., *Listeriosis in humans*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 75-95.

Smith GA, Portnoy DA., The role of two phospholipases in the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*, *Infect Agents Dis.* 1993 Aug;2(4):183-5.

Smith JM, Feil EJ, Smith NH., Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria, *Bioessays.* 2000 Dec;22(12):1115-22. Review.

Spratt BG, Maiden MC., Bacterial population genetics, evolution and epidemiology, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999 Apr 29;354(1384):701-10. Review.

Struelens MJ., Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems, *Clin Microbiol Infect.* 1996 Aug;2(1):2-11.

Swaminathan B., Gerner-Smidt P., *The epidemiology of Human listeriosis*, *Microbes and infection*, 2007; 1236-1243.

Todd E. C. D., Notermans S., *Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, Listeris monocytogenes*, *Food Control*, 2011; Vol. 22; 1484-1490.

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.

Valderrama W. B., Cutter C. N., *An Ecological Perspective of Listeria monocytogenes Biofilms in Food Processing Facilities* *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013; 53: 801–817.

Valsecchi M. G., C. La Vecchia, *Epidemiologia e metodologia epidemiologica clinica*, *Accademia Nazionale di Medicina*, 1999.

van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology, *Clin Microbiol Infect.* 2007 Oct;13 Suppl 3:1-46.

Vazquez-Boland J. A., Khum M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G, Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J., *Listeria pathogenesis and virulence determinants* *Clinical Microbiol Rev*, 2001; Vol. 14, No. 3: 584-640.

Vergheze B, Lok M, Wen J, Alessandria V, Chen Y, Kathariou S, Knabel S., *comK prophage junction fragments as markers for Listeria monocytogenes genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence*, *Appl Environ Microbiol.*

2011 May;77(10):3279-92. doi: 10.1128/AEM.00546-11. Epub 2011 Mar 25. Erratum in: Appl Environ Microbiol. 2011 Jul;77(14):5064.

Verghese B, Schwalm ND 3rd, Dudley EG, Knabel SJ., A combined multi-virulence-locus sequence typing and Staphylococcal Cassette Chromosome mec typing scheme possesses enhanced discriminatory power for genotyping MRSA, Infect Genet Evol. 2012 Dec;12(8):1816-21. doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.026. Epub 2012 Aug 26. Erratum in: Infect Genet Evol. 2013 Jun;16:449.

Vines A, Swaminathan B., Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of listeria monocytogenes strains representing clinically important serotypes, Curr Microbiol. 1998 May;36(5):309-18.

Weis J., Seeliger H. R., *Incidence of Listeria monocytogenes in nature*, Applied Microbiology, 1975; Vol. 30, No 1: 29-32.

Wellinghausen N., *Listeria and Erypelothrix*, in Versalovic J., Carrol K. C., Funke G., Jorgensen J. H., Landry M. L., Warnock D. W. (a cura di), Manual of Clinical Microbiology, 10th edition, 2011; 25: 403-412.

Wesley I. W., *Listeriosis in animals*, in E. T. Ryser, E. H. Marth (a cura di), Listeria, Listeriosis, and food safety, 2nd edition, 1999; 39-73.

Wiedmann M., *Molecular subtyping methods for Listeria monocytogenes*, Wiedmann: Journal of AOAC international, 2002; Vol 85, No. 2.

Yao J. D. C., Moellering R. C. jr, *Antibacterial Agents*, in J. Versalovic, K. C. Carrol, G. Funke, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, D. W. Warnock (a cura di), Manual of Clinical Microbiology, 10th edition, 2011; 65; 1043–1081.

Zenewicz L. A., Shen H., *Innate and adaptative immune responses to Listeria monocytogenes: a short overview*, Microbes Infect, 2007; 1208-1215.

Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ, Multi-virulence-locus sequence typing of Listeria monocytogenes, Appl Environ Microbiol. 2004 Feb;70(2):913-20.

SITOGRAFIA

Annual Epidemiological Report – 2012 in www.ecdc.europa.eu

Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2007 in www.ecdc.europa.eu

CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States in www.cdc.gov;

CIFOR-Guidelines for foodborne disease outbreak response, Chapter 2; in www.cifor.us;

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, in www.eucast.org;

Listeria in www.epicentro.iss.it;

MAINF in www.mainf.regione.lombardia.it;

Ministero della Salute, Sistemi di sorveglianza, in www.salute.gov.it;

Risk Assessment – Listeria monocytogenes in Retail Delicatessens Interpretative Summary, 2013 in www.fda.gov;

Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in www.who.int

Sistema di Sorveglianza delle Malattie invasive batteriche coordinata dal Dipartimento delle Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate in www.epicentro.iss.it;

Standard operating procedure for PulseNet of Listeria monocytogenes, in www.cdc.gov

The Community Summary Report - Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008 in www.efsa.europa.eu

The European Surveillance System www.ecdc.europa.eu

The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, in www.efsa.europa.eu;

Tossinfezioni alimentari in www.epicentro.iss.it;

Trends in foodborne illness in the United States, 1996-2012 in www.cdc.gov;

www.demostat.it;

www.pasteur.fr/mlst

<https://sites.google.com/site/mlstdatabase/home>

Riferimenti Legislativi

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?qid=1452447611432&uri=CELEX:32005R2073>

http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1357_allegato.pdf

MAINF - Malattie Infettive	
Pratica di Malattia Infettiva	
Dati paziente	
Cognome	
Sesso	
Comune di nascita	
Codice fiscale	
Nazione di nascita	Data ritorno viaggio
Anagrafe Dettaglio	
Comune Domicilio	
Indirizzo Domicilio	
Comune Residenza	
Indirizzo Residenza	
Occupazione	
Dati generali	
Dati generali	
Codice pratica	
Reclutata dalla pratica	
Data apertura pratica	
Stato pratica	Data chiusura pratica
Notificata da altra Regione	
Esito malattia	
Anamnesi	
ASL di diagnosi	
Inizio sintomi	
Data inizio sintomi	
Comune inizio sintomi	Provincia inizio sintomi
Nazione conugio	Regione conugio
Comune conugio	Provincia conugio
Struttura ricovero	
Altra struttura ricovero	
Segnalazione	
Data segnalazione	
Medico segnalazione	
Vaccino	
Vaccinato?	
Dati amministrativi	
Data primo invio manuale	
Data ultimo invio	
Stato validazione criterio Nazionale	Data ultima validazione
Stato validazione criterio Nazionale	Data ultima validazione
Permessi di lettura e modifica ASL	

Allegato 1: Pratica relativa ai casi di listeriosi notificati, estratta dal sistema informatico MAINF.

Scheda Raccolta Dati per i casi di Listeriosi	
- atton d'inchio	
<p>Dati anagrafici del paziente</p> <p>Nome e cognome (iniziali):</p> <p>Data nascita: <input type="checkbox"/> Maschio <input type="checkbox"/> Femmina</p> <p>Comune di residenza:</p> <p>Provincia e Regione:</p>	
<p>Dati riguardanti il neonato</p> <p>Ospedale:</p> <p>Comune:</p> <p>Provincia e Regione:</p> <p>Data nascita:</p> <p>Diagnosi:</p> <p>Esito: <input type="checkbox"/> Dimesso <input type="checkbox"/> Deceduto</p> <p>Manifestazioni cliniche:</p> <p><input type="checkbox"/> Settlicemia</p> <p><input type="checkbox"/> Meningite</p> <p><input type="checkbox"/> Meningococcalite</p> <p><input type="checkbox"/> Infezioni focali (specificare):</p> <p><input type="checkbox"/> Altri (specificare):</p>	
<p>Dati riguardanti la gravidanza (*)</p> <p><input type="checkbox"/> Aborto <input type="checkbox"/> Nato morto <input type="checkbox"/> Nato prematuro (!) <input type="checkbox"/> Nato a termine (!)</p> <p>(!) indicare se sono presenti e specificare le seguenti infezioni:</p> <p><input type="checkbox"/> Settlicemia <input type="checkbox"/> Infezioni focali (specificare)</p> <p><input type="checkbox"/> Meningite <input type="checkbox"/> Polmonite</p> <p><input type="checkbox"/> Meningococcalite <input type="checkbox"/> Altro (specificare)</p> <p>Analisi e richiesta presso:</p> <p>Laboratorio ospedaliero:</p> <p>Comune:</p> <p>Regione e Provincia:</p> <p>data del prelievo:</p> <p>Tipo di esame biologico:</p> <p><input type="checkbox"/> Sangue</p> <p><input type="checkbox"/> Liquor</p> <p><input type="checkbox"/> Altro (specificare)</p> <p><input type="checkbox"/> Non note</p>	
<p>Casi riguardanti il compilatore</p> <p>Nome e cognome:</p> <p>Struttura:</p> <p>Data della compilazione:</p> <p>Telefono:</p> <p>E-mail:</p>	

* Se si è in possesso di maggiori informazioni, utilizzare la scheda specifica per i casi perinatali

Allegato 2: Scheda di raccolta dati per i casi di Listeriosi utilizzata per la segnalazione dei casi al Laboratorio enterobatteri (ex CEPIS) del Dipartimento di Scienze della Salute

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno fornito un contributo reale nella realizzazione del presente lavoro di Tesi e senza i quali l'elaborato non avrebbe avuto la stessa qualità scientifica.

Ringrazio, inoltre, tutte le persone che hanno contribuito alla mia crescita sia dal punto vista umano che professionale.

Prof.ssa Pontello M. (Relatore) e Prof.ssa Tanzi E. (Coordinatore) – Università degli Studi di Milano, Dottorato in Sanità Pubblica, Milano.

Prof. Knabel S.J. (Mentor) – The Pennsylvania State University, Department of Food Science, State College, PA, USA.

Dr.ssa Lomonaco S. e Dr.ssa Filipello V. – Università degli Studi di Torino, Facoltà di Scienze Veterinarie, Grugliasco, Torino.

Dr. Parisi A. - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Putignano, Bari.

Dr.ssa Losio N.M., Dr.ssa Panteghini C, Dr.ssa Tilola M. - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Dr.ssa Gianfranceschi M. e Dr.ssa Gattuso A. - Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma.

Dr.ssa Piatti A. e Dr.ssa Gramegna - Regione Lombardia, Direzione Generale Welfare, U.O. Prevenzione.

Laboratorio di Referenza Regionale (CEPIS) ed i miei colleghi Pol, Maria, Marzia e Giulia.

Prof.ssa Bossi A. e Dr.ssa Zolin A. – Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Milano.

Dr.ssa Matuonto I. – Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Matematica, Milano.

Prof.ssa Mammina C. – Università degli Studi di Palermo, Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute e Materno-Infantile, Palermo.

Prof.ssa Stefani S. – Università degli Studi di Catania, Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Catania.

Dr.ssa Tesauro M. e Dr.ssa Consonni M. – Università degli Studi di Milano, Dipartimento Scienze Biomediche, Chirurgiche ed Odontoiatriche, Milano.

Dr.ssa Barbuti S., Dr.ssa Frustoli M.A. e Dr.ssa Grisenti S. – Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (SSICA), Dipartimento di Microbiologia, Parma.

La mia famiglia e le persone a me più care.