



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana

CURRICULUM IN SANITÀ PUBBLICA

Responsabile di Curriculum: Prof. Andrea Piana

XXIX CICLO

**STRATEGIE DI SORVEGLIANZA ATTIVA E
NETWORKING PER IL CONTROLLO DELLE INFEZIONI
DA *LISTERIA MONOCYTOGENES***

Coordinatore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Erica Mura

Anno Accademico 2015– 2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag. 4
1.1.1 Tassonomia	Pag. 4
1.1.2 Caratteristiche microbiologiche	Pag. 7
1.1.3 Ecologia e habitat di <i>L.monocytogenes</i>	Pag. 11
1.2 Listeriosi	Pag. 15
1.2.1 Patogenesi	Pag. 28
1.2.2 Ciclo replicativo	Pag. 31
1.2.3 Principali determinanti di virulenza e loro regolazione	Pag. 35
1.2.4 Terapia e Antibiotico-Resistenza	Pag. 38
1.2.5 Tipizzazione molecolare di <i>L.monocytogenes</i>	Pag. 43
1.3 Risposta immunitaria dell'ospite	Pag. 49
1.4 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia della listeriosi	Pag. 53
1.4.1 Alimenti a rischio e quadro normativo	Pag. 65
2. SCOPO DEL LAVORO	Pag. 70
3. MATERIALI E METODI	Pag. 74
4. RISULTATI	Pag. 102
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag. 113
6. BIBLIOGRAFIA	Pag. 118

1. INTRODUZIONE

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi, infezione definita rara dall'Organizzazione Mondiale della Sanità rispetto ad altre malattie a trasmissione alimentare, ma il cui impatto mondiale in Sanità Pubblica è notevole per l'elevata mortalità e l'alto tasso di ospedalizzazione che la caratterizzano [39; 141].

Da batterio essenzialmente saprofita, che sopravvive fino a 10-12 anni in materiale vegetale in decomposizione, può rivelarsi un pericoloso patogeno intracellulare opportunistico, in grado di colpire soggetti debilitati o con deficit del sistema immunitario [12; 121; 152]. Tra le fasce di popolazione a rischio, oltre a donne in stato di gravidanza e neonati, rientrano anziani e soggetti sottoposti a trattamento con farmaci immunosoppressivi, tra cui quelli utilizzati nelle terapie antitumorali, categorie in costante crescita nei Paesi industrializzati. Nei soggetti immunocompetenti, l'infezione si presenta in forma lieve con febbre e/o sintomi gastrointestinali. Di conseguenza, le infezioni sub-cliniche spesso non vengono segnalate e la listeriosi umana viene diagnosticata quasi esclusivamente nelle manifestazioni di setticemia, meningite, meningoencefalite e aborto, rendendo estremamente difficile la stima del reale impatto dell'infezione nella popolazione.

L'attenzione nei confronti del microrganismo nell'ambito della sicurezza alimentare è fortemente aumentata a seguito della recente e rapida espansione del mercato degli alimenti ready-to-eat e heat-to-eat (cibi pronti al consumo o cibi assemblati e pronti a cottura rapida o dopo un blando riscaldamento), categorie di prodotti coinvolti nella maggior parte dei casi epidemici di listeriosi [84]. Infatti, pur essendo un microrganismo asporigeno, è in grado di resistere a molteplici condizioni ambientali

sfavorevoli, tra cui pH acido, alte concentrazioni di cloruro di sodio, temperature di refrigerazione, presenza di sostanze disinfettanti e altri parametri chimico-fisici che caratterizzano gli alimenti o che sono legati alle tecniche di produzione e conservazione degli stessi. Grazie anche alla capacità di produrre biofilm, che rendono difficile e a volte impossibile la decontaminazione delle superfici, rappresenta attualmente uno dei temi di maggior interesse per l'industria alimentare [141; 98].

Numerose sono le azioni intraprese a livello globale per limitare l'incidenza delle listeriosi, tra cui l'istituzione di reti di sorveglianza, sia nella Comunità Europea che negli Stati Uniti, dove addirittura vige la politica della 'tolleranza zero' per tutti i cibi pronti al consumo fin dagli anni '80, analogamente a quanto stabilito in Nuova Zelanda e Australia. *L. monocytogenes* è stato a lungo utilizzato come modello di riferimento per lo studio dei microrganismi intracellulari, soprattutto per esaminare le interazioni ospite-patogeno e il meccanismo di stimolazione della risposta immunitaria. Infatti, è uno dei pochi patogeni intracellulari in grado di aderire e invadere la cellula ospite, seguendo un tropismo per specifici tipi cellulari, di moltiplicare nel citoplasma e diffondere alle cellule vicine provocando una forte risposta immunitaria cellulo-mediata senza, tuttavia, essere completamente eliminato dall'ospite. Resiste inoltre alla fagocitosi dei macrofagi e l'infezione primaria genera cellule T di memoria con effetto protettivo verso infezioni successive. Per tali motivi, negli ultimi anni diversi studi di immunologia si sono focalizzati su *L. monocytogenes* per la realizzazione di vaccini attenuati o sul suo utilizzo come vettore per la distribuzione di molecole anti-infettive e vaccini contro il cancro [152; 126; 175].

Studi filogenetici e di caratterizzazione fenotipica o molecolare hanno ormai accertato che *L. monocytogenes* rappresenta una popolazione

strutturata, composta da ceppi che differiscono tra loro, soprattutto per ecologia e associazione ospite-patogeno. Data la diffusa presenza e l'estrema variabilità nella virulenza, molteplici sono le tecniche molecolari messe a punto e correntemente utilizzate per individuare le differenze esistenti all'interno della specie. Tali metodiche, rappresentano un valido supporto per tipizzare ceppi isolati da casi clinici o listeriosi animale, da alimenti o ambiente, in base a differenze nelle sequenze degli acidi nucleici; esse sono indispensabili per individuare i focolai di infezione e stabilire i legami epidemiologici nell'ambito della sorveglianza di routine o nelle indagini su eventi epidemici. Sono inoltre essenziali per il monitoraggio della contaminazione negli impianti di produzione/distribuzione degli alimenti, ma anche per comprendere l'ecologia, l'evoluzione e la struttura della popolazione microbica e per definire le specifiche caratteristiche di virulenza dei ceppi di *L. monocytogenes* [121; 58; 128]. Il metodo di riferimento per la tipizzazione molecolare di tale microrganismo è la Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), utilizzata per la sorveglianza delle listeriosi, sia nella Comunità Europea che negli Stati Uniti, mediante la creazione di un database condiviso contenente i profili genetici dei ceppi identificati nei diversi Paesi. Ulteriori metodiche basate su restrizione enzimatica, tra cui la AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), sono largamente utilizzate per la caratterizzazione molecolare dei microrganismi patogeni in studi epidemiologici e/o tassonomici [155; 35]. Tra le tecniche di biologia molecolare rientra la Real-Time PCR, metodica altamente sensibile ed accurata, che permette l'identificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. Grazie alla capacità di riconoscere uno specifico target molecolare, costituisce una strategia rapida, ad alta sensibilità e specificità,

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

utilizzata per l'identificazione e la quantificazione di microrganismi patogeni.

Molteplici fattori di virulenza sono stati individuati in *L. monocytogenes*, i quali vengono attivati durante l'infezione dell'ospite, segnando la transizione da saprofita extracellulare a patogeno opportunista nell'ambiente intracellulare [2; 20]. Infatti, affinché possa instaurarsi l'infezione, è necessario che tali geni vengano espressi in quantità adeguata ed in modo coordinato nelle diverse fasi del ciclo infettivo. Inoltre, numerosi geni vengono espressi in risposta a stress di diversa natura e tale capacità è fondamentale per la sopravvivenza nell'ambiente esterno e allo stesso tempo costituisce un prerequisito per la virulenza, in quanto permette di colonizzare svariate matrici alimentari e di superare le condizioni ostili che il patogeno incontra nell'attraversamento del tratto gastrointestinale dell'ospite [2].

La comprensione di tali meccanismi molecolari e la caratterizzazione dei ceppi potenzialmente più virulenti sono aspetti fondamentali per il controllo della listeriosi, in quanto consentono di migliorare le attività di sorveglianza e di prevenzione del rischio associato a *L. monocytogenes* per la salute umana, soprattutto nelle fasce più sensibili della popolazione.

1.1 LISTERIA MONOCYTOGENES

1.1.1 Tassonomia

L'identificazione di *L. monocytogenes* risale al 1926 a Cambridge, nel Regno Unito, quando Murray, Webb e Swann intuirono che tale batterio era l'agente eziologico di leucocitosi mononucleare in conigli e porcellini d'India di laboratorio, da cui il nome *Bacterium monocytogenes* [116]. Nel 1927 Pirie isolò lo stesso microrganismo da gerbilli infetti in

Sud Africa e denominò il genere *Listerella*. L'attuale denominazione *L. monocytogenes*, è stata concordata nel 1940 in onore del chirurgo inglese sir Joseph Lister. Inizialmente, si era ipotizzato che tali batteri fossero correlati con i corineformi, collocandoli nella famiglia delle *Corynebacteriaceae* nella settima edizione del Bergey's Manual. Dai dati di sequenziamento del gene 16S rRNA il genere *Listeria* (insieme al genere *Brochothrix*) è stato classificato nella famiglia Listeriaceae, ampliando nel 2001 l'Ordine Bacillales, che include anche Staphylococcaceae, Bacillaceae e numerosi altri generi (*Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Thermoactinomycetaceae*, *Planococcaceae*). *Listeria* spp. presenta bassi valori di mol% G+C (<50%) e una stretta correlazione con i generi *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Clostridium* [82; 68]. Dal confronto del genoma di *L. monocytogenes* e *L. innocua* è emersa una stretta relazione con *Bacillus subtilis*, facendo ipotizzare un'origine comune [38] (Fig. 1A).

Il genere *Listeria* comprende: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* e *L. grayi* [128]. A queste specie se ne aggiungono altre due descritte nel 2012: *L. fleischmannii* e *L. weihnstephanensis* [95; 16]. *L. ivanovii* è stata identificata nel 1985 [149] e suddivisa nelle sottospecie *L. ivanovii subsp. ivanovii* e *L. ivanovii subsp. londoniensis* [68]. Un'ulteriore specie, denominata *L. murrayi* era stata identificata, ma successivamente riconosciuta come sottospecie di *L. grayi* [142].

L. monocytogenes e *L. ivanovii* rappresentano le uniche specie associate a patologie nell'uomo e, sebbene il cluster di virulenza che caratterizza *L. monocytogenes* sia presente anche in *L. seeligeri*, quest'ultima risulta non patogeno per l'uomo [38; 64; 72]. *L. monocytogenes* nell'uomo causa una grave malattia di origine alimentare, la listeriosi, ma è anche in grado di

provocare infezioni invasive negli animali (meningiti e aborti). *L. ivanovii* provoca, invece, prevalentemente infezioni nei ruminanti, principalmente ovini e caprini, caratterizzate per lo più da episodi di meningoencefalite e/o aborto nelle pecore gravide, ma è stata anche associata, seppur raramente, con infezioni nell'uomo [71]. *L. seeligeri* e *L. welshimeri* solo raramente sono causa di malattia negli animali, mentre *L. grayi* e *L. innocua* sono considerate non patogene [131]. Specie patogene e non patogene sono strettamente correlate, infatti, dal punto di vista filogenetico si ipotizza un ceppo ancestrale comune tra *L. monocytogenes* e *L. innocua*, così come tra *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* (Fig. 1B).

L. monocytogenes risulta strettamente correlata con *L. innocua* e *L. marthii*. *L. ivanovii* mostra invece una maggiore similarità genetica con *L. seeligeri*. La specie *L. grayi* è geneticamente distante dalle altre, tanto da ipotizzare che possa costituire un genere (*Murraya*) a parte [38]. E' stato ipotizzato che nel comune antenato di *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* fosse presente il cluster di virulenza, ma due eventi indipendenti di delezione abbiano portato ad una riduzione nei genomi di *L. innocua* e *L. welshimeri*, passando da una specie ancestrale patogena ad una non patogena [68; 120].

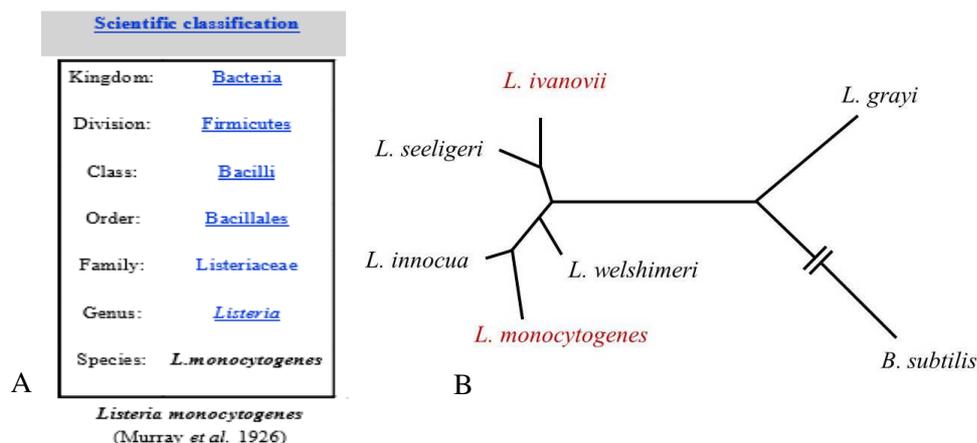


Figura 1: (A) Classificazione di *L. monocytogenes*. (B) Albero filogenetico delle relazioni filogenetiche tra le diverse specie di *Listeria* spp.

1.1.2 Caratteristiche microbiologiche

L. monocytogenes è un batterio gram positivo di dimensioni ridotte (0,5-2 μm per 0,4-0,5 μm), anaerobio facoltativo, asporigeno, privo di capsula, di forma bastoncellare e con tendenza al pleomorfismo; questa caratteristica permette di osservare il batterio sotto forma allungata e filamentosa o cocco-bacillare. Spesso più bastoncelli si organizzano in corte catene che raggiungono una lunghezza massima di 620 μm . Infatti all'osservazione al microscopio ottico *L. monocytogenes* si presenta con una tipica disposizione "a palizzata". Il microrganismo è dotato di un motilità di tipo "tumbling" grazie alla presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5) 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 [170] (Fig. 2). Dal punto di vista biochimico 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. *L. monocytogenes* è un microrganismo fermentante che produce acidi a partire da diversi zuccheri (glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, cellobiosio, trealosio e saccarosio). 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. *L. monocytogenes* è considerata una specie psicrotrofa in grado di crescere in un intervallo di temperatura particolarmente ampio, da 2 a 45°C, con un optimum tipico dei mesofili (30-37°C) [170]. In presenza di temperatura ottimale di sviluppo si moltiplica in un range di pH tra 4,4 e 9,6 con optimum a 7,1. Il valore di aw che costituisce il limite inferiore per lo sviluppo è compreso tra 0.90 e 0.92 [54]. *L. monocytogenes* è un

microrganismo alotollerante (concentrazioni NaCl fino a 8-10% e A_w minima 0,90-0,88) e riesce a sopravvivere in mezzi colturali liquidi (Brain Heart Infusion) contenenti 11% di NaCl [23]. Resiste a diverse condizioni ambientali sfavorevoli e rispetto ad altri microrganismi non sporigeni rappresenta il più termoresistente; sono infatti necessari 10 secondi a 72,3°C o 1 secondo a 85°C per la sua inattivazione. Non è in grado di ridurre i nitrati e di idrolizzare l'urea, non produce idrogeno solforato e indolo, presenta attività lipolitica e β emolitica ed è grado di idrolizzare l'esculina presente nella bile.

La composizione della parete cellulare è simile a quella di altri batteri Gram-Positivi ed è costituita principalmente da peptidoglicani (35% del peso secco), acidi tecoici (60-70% del peso secco) e acidi lipoteicoici [170].

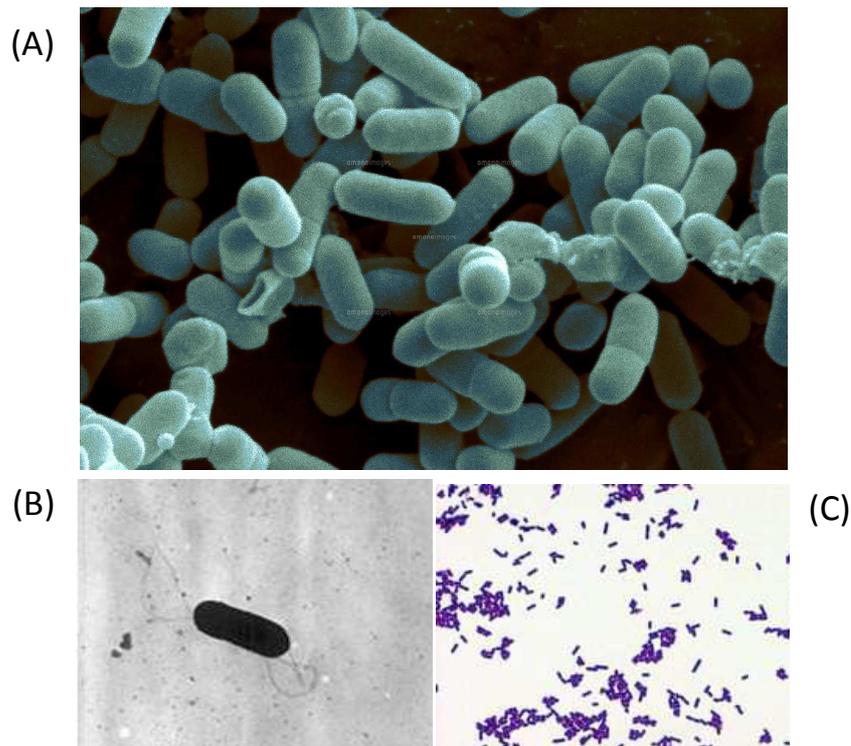


Figura 2: (A, B) Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di *L.monocytogenes*; (C) colorazione di Gram

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 [70]. 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 [54, 24]. 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 [24].

L. monocytogenes 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'estruzione di protoni dalla cellula. È importante sottolineare che l'esposizione a pH lievemente acido induce in *L. monocytogenes* un fenomeno di adattamento che le permette in un secondo momento di resistere a condizioni di acidosi più spinte [27; 54].

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 [54].

L. monocytogenes 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, *L. monocytogenes* è in grado di degradare i sali biliari, resistendo quindi alla loro attività battericida [152].

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*” [27].

Caratteristica cruciale di *L. monocytogenes* 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 di stress. Per esempio ceppi di *L. monocytogenes* 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 [54]. Per concludere è importante ricordare che *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes*, 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. [54; 163]. Nelle industrie alimentari la presenza di biofilm mono- o pluri-colturali di *L. monocytogenes* 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 [54].

1.1.3 Ecologia e habitat di *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes*.

I batteri appartenenti al genere *Listeria* ed in particolare *L. monocytogenes* sono microrganismi ubiquitari che grazie alle loro spiccate caratteristiche di resistenza e adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli, permettono loro di diffondere negli ambienti più disparati [145]. Sono comunemente isolati da suolo, vegetali, liquami, acqua, mangimi, una vasta gamma di alimenti di origine animale e vegetale sia

crudi che processati, scarti della macellazione e feci di animali in buono stato di salute, tra cui l'uomo. Si stima che circa 1-6% della popolazione ospiti il patogeno nel tratto intestinale senza manifestazioni cliniche [128]. L'utilizzo di tecniche di caratterizzazione molecolare e sub-tipizzazione applicate agli isolati di varia provenienza ha anche evidenziato che esistono delle associazioni tra alcuni ceppi o specie e determinati ambienti, nell'ambito dei quali gli stessi microrganismi persistono per periodi anche molto lunghi. Ad esempio, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* sono più frequentemente isolate da ambienti rurali mentre *L. innocua* e *L. monocytogenes* in ambienti urbani [145].

Il naturale habitat di *L. monocytogenes* è rappresentato da materiale vegetale in decomposizione, in cui sopravvive fino a 10-12 anni da saprofita [3]. *L. innocua* è spesso isolata negli alimenti ed essendo molto simile a *L. monocytogenes* dal punto di vista fisiologico rappresenta un organismo indicatore del rischio di contaminazione da *Listeria* spp. nel prodotto finito o inadeguate condizioni igieniche [99].

Numerose ricerche hanno dimostrato che *Listeria* spp., in genere, e *L. monocytogenes* in particolare, possono rinvenirsi in numerose specie animali, selvatiche e domestiche, soprattutto pecore, capre, bovini, alpaca, ma anche molti uccelli, pesci e crostacei [92]. In alcuni di questi animali il batterio provoca particolari malattie, come la "malattia della corsa in cerchio" delle pecore e la mastite dei bovini. Una volta guariti, gli animali possono rimanere portatori asintomatici e continuare ad eliminare *L. monocytogenes* con le feci ed il latte. Non sorprende pertanto di trovare così spesso il microrganismo nel terreno, nei fanghi di depurazione, nelle acque superficiali e nella vegetazione [42]. Si ritrova anche nei foraggi insilati, considerati come una delle principali fonti di listeriosi nei ruminanti, ai quali vengono normalmente somministrati, e che, per tale

ragione, viene anche chiamata “la malattia degli insilati”. Gli animali possono acquisire l’infezione non solo tramite l’assunzione di insilati contaminati, ma anche per contatto diretto con l’ambiente esterno. L’immissione diretta delle deiezioni animali nei campi o il loro utilizzo per interventi di fertilizzazione organica insieme con le acque superficiali utilizzate per l’irrigazione contribuiscono all’ulteriore diffusione del patogeno nei foraggi e nei vegetali. Durante il processo di fermentazione degli insilati 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 *L. monocytogenes* è inibita, per cui se anche fosse stata presente nella materia prima, non raggiungerebbe una quantità elevata e pericolosa [50]. 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 *L. monocytogenes* può moltiplicarsi [78]. 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 [50].

La sopravvivenza del batterio nel suolo è stata oggetto di alcuni studi sperimentali condotti da ricercatori inglesi e francesi [119; 59] i quali hanno accertato che la *L. monocytogenes* sopravvive nei liquami liquidi e nelle acque di scolo dell’allevamento per un periodo di tempo superiore a tre mesi, mentre nel letame solido fermentato a causa dell’eccessivo

innalzamento della temperatura per processi di fermentazione organica sopravvive per non più di un mese. I tempi di persistenza del batterio vitale sul terreno dopo distribuzione del letame sono simili a quelli riscontrati nei liquami e si prolungano nel periodo invernale per la sua psicrotrofia.

Il microrganismo può facilmente diffondere negli stabilimenti alimentari e colonizzare ambienti di lavoro, superfici, attrezzature, operatori, materie prime e prodotti finiti. La persistenza di *L. monocytogenes* negli impianti di lavorazione alimentare può essere inoltre fortemente favorita dalla sua capacità di formare biofilm che le conferiscono anche una certa protezione nei confronti dei detergenti battericidi. La sopravvivenza di *L. monocytogenes* in questi ambienti è documentato essere superiore talvolta a dieci anni [172]. Le matrici alimentari maggiormente soggette a fenomeni di contaminazione sono sia i prodotti di origine animale, in particolare formaggi molli, latte crudo o pastorizzato in maniera incompleta, carne pronta al consumo, carne cruda, salumi crudi, pollame crudo, prodotti della pesca e dell'acquacoltura, in salamoia e affumicati, che i prodotti di origine vegetale, in particolare le verdure [159].

Il carattere ubiquitario di *L. monocytogenes* fa in modo che uomo e animali siano frequentemente esposti a questo microrganismo, 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 [47]. Nella diffusione della *L. monocytogenes* alcuni studiosi riconoscono all'uomo oltre che un ruolo attivo anche un ruolo passivo quale portatore asintomatico in percentuale variabile tra il 2% e il 6% degli individui sani [144; 86].

La capacità di *L. monocytogenes* 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 [50] (Fig. 3).

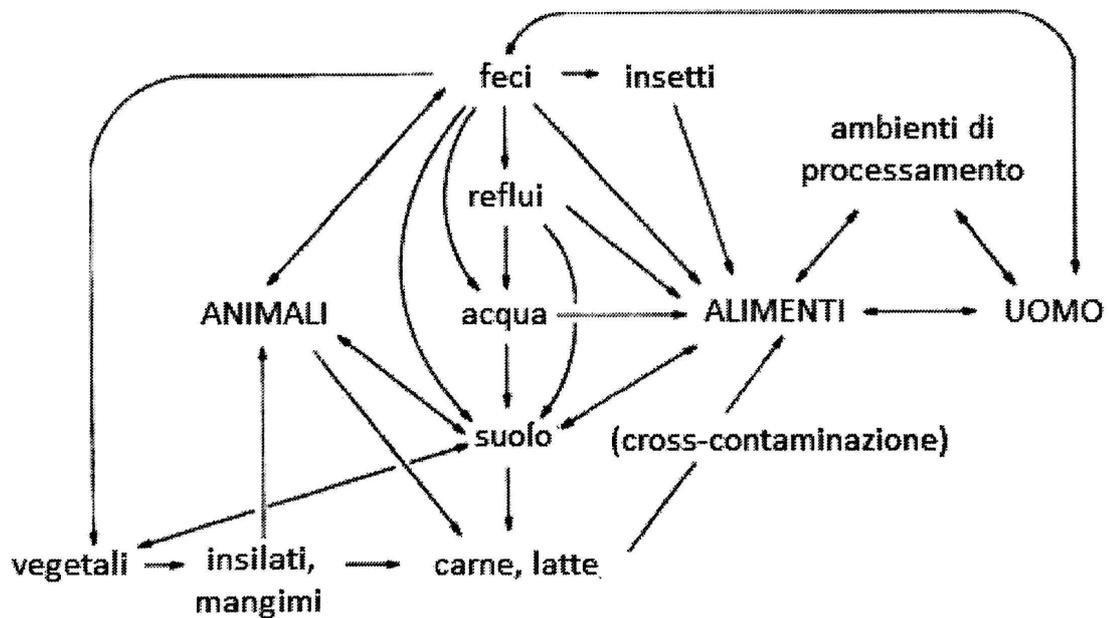


Figura 3: Diffusione ambientale e trasferimento di *L. monocytogenes* agli animali e all'uomo.

1.2 Listeriosi

La listeriosi è una zoonosi appartenente al gruppo delle malattie trasmesse da alimenti, nel cui ambito, a causa proprio dell'elevato tasso di mortalità (20-30%), riveste un ruolo importante in Sanità Pubblica. Nonostante evidenze della malattia siano state descritte fin dalla fine dell'800 in diversi animali, il primo caso umano è stato riportato nel 1929. L'emergenza di questa patologia si è verificata alla fine degli anni 80', quando si sono registrati i primi focolai epidemici associati al consumo di alimenti contaminati.

L'infezione si realizza sia attraverso il contatto diretto o indiretto con secreti ed escreti di animali infetti oppure più frequentemente in seguito all'ingestione di prodotti di origine animale/vegetale contaminati da *L.*

monocytogenes. Gli alimenti più a rischio come fonte di infezione sono generalmente quelli che rientrano nella categoria dei “*ready to eat*” (RTE- alimenti pronti al consumo) definiti “quei prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti” [139]. Questi prodotti sono rappresentati da latte crudo o pastorizzato in maniera incompleta, formaggi, carne cruda, salumi, alcuni prodotti ittici e prodotti vegetali [7]. Nell’uomo, il batterio si comporta da saprofita; il contagio interumano è raro nonostante sia possibile la trasmissione madre-feto per via transplacentare o durante il parto.

Sebbene l’esposizione della popolazione all’infezione da parte di *L. monocytogenes* sia molto ricorrente a causa della elevata prevalenza del patogeno negli alimenti [136], perché si manifesti la patologia è necessario il concorso di più fattori: la carica infettante, la virulenza del ceppo di *L. monocytogenes* e la suscettibilità dell’ospite.

Dose infettante:

Il potenziale patogeno di *L. monocytogenes* 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 [164]. Indicativamente si ritiene che possa variare dalle 10² ufc alle 10⁹ ufc [83]. Negli alimenti implicati in eventi epidemici, la carica rilevata si aggira generalmente attorno a 10⁶ 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 [164]. 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.

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 *L. monocytogenes*. Questo limite si suppone possa garantire un'adeguata tutela della salute dell'intera popolazione [161]. 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 [1].

Virulenza del ceppo:

Più studi suggeriscono che tra i vari ceppi di *L. monocytogenes* esiste una differente virulenza, quindi una diversa capacità di provocare infezione e di indurre l'insorgenza della patologia. *L. monocytogenes* può essere classificata in base all'appartenenza ad uno dei 4 sierogruppi (indicati come 1/2, 3, 4 e 7) sinora individuati. Tale classificazione si basa sulla presenza di 15 antigeni somatici O, stabili al calore (acidi teicoici), identificati con un numero da I a XV, e 5 antigeni flagellari H (A, B, C, D, E) sensibili al

calore [128]. Tali sierogruppi sono suddivisi a loro volta in tredici sierotipi: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e ed infine 7 [171] (Tab.1).

Tabella 1. Sierogruppi ed antigeni di *L. monocytogenes*

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

Dei 13 sierotipi di *L. monocytogenes*, tre risultano associati a circa il 95% dei casi di listeriosi, e sono il 4b, 1/2a e 1/2b [136]. 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 [136; 164].

È stato osservato che ceppi appartenenti al sierotipo 1/2a a 4°C sopravvivono alle batteriocine meglio dei ceppi 4b, inoltre presentano maggiore capacità di sopravvivenza durante il passaggio nell'ambiente gastrico e sono in grado di replicarsi nell'alimento con velocità ed intensità

maggiore rispetto agli altri sierotipi [128]. Questo potrebbe spiegare il fatto che i ceppi isolati da alimenti appartengono per la maggior parte al gruppo antigenico 1/2 (1/2a, 1/2b, 1/2c) e sono in maggioranza di sierotipo 1/2a, mentre gli isolati di sierotipo 4b si riscontrano in genere nel 10-12% degli alimenti contaminati [128]. Al contrario, gli isolati di *L. monocytogenes* appartenenti al sierotipo 4b sopravvivono meglio al trattamento al calore dopo refrigerazione rispetto ai sierotipi 1/2a. Inoltre dopo refrigerazione, i ceppi di sierotipo 4b posti a 37°C sono in grado di replicarsi più velocemente rispetto ai ceppi di sierotipo 1/2a, mostrando talvolta una patogenicità superiore. Queste caratteristiche giustificano la maggiore capacità patogena per l'uomo dei sierotipi 4b [128]. 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 [104; 133].

Un gran numero di studi filogenetici e di sottotipizzazione hanno, inoltre, dimostrato che i vari ceppi di *L. monocytogenes* formano una popolazione strutturata, composta di linee evolutive divergenti [128]. I metodi di tipizzazione molecolare (Multilocus Enzyme Electrophoresis - MEE), Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE, Ribotyping, Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP e Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP, hanno confermato l'esistenza di un differente potenziale patogeno dei ceppi di *L. monocytogenes*, che è stata suddivisa in quattro distinte linee evolutive (Lineages I, II, III, IV), [128]. Nel Lineage I si ritrovano i sierotipi più comunemente associati con casi clinici umani, in particolare i sierotipi 1/2b e 4b, nel Lineage II, invece, i sierotipi isolati

con maggiore frequenza sono correlati agli alimenti o all'ambiente, come ad esempio il sierotipo 1/2a [128]. Il Lineage III è considerata una divisione tassonomica distinta e comprende sierotipi isolati meno comunemente, quali il 4a ed il 4c. Sia nel Lineage III che nel Lineage IV i sierotipi sono stati isolati prevalentemente da ruminanti [128].

Suscettibilità dell'ospite:

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 [21]. 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 *L. monocytogenes* viene considerato un patogeno opportunisto [158; 164]. Possiamo individuare le seguenti categorie di soggetti a rischio:

- neonati, il cui sistema immunitario non è ancora completamente sviluppato né del tutto efficiente [100];
- anziani, nei quali l'attività del sistema immunitario è fisiologicamente ridotta per un fenomeno di immunosenescenza [114];
- 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 [94];
- 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 [100];

- 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;
- 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 [100];
- soggetti con infezione da HIV (Human Immunodeficiency Virus), che riduce il numero di linfociti T, anche se ad oggi le infezioni di *L. monocytogenes* 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 [158];
- 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;
- soggetti diabetici, nei quali il cattivo controllo della glicemia risulta associato a uno scorretto funzionamento dei fagociti [100].

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 *L. monocytogenes* nel suo ruolo di patogeno umano [153]. Uno studio francese del 2012 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 *L. monocytogenes*. 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 [66].

L'infezione causata da *L. monocytogenes* può dare origine a due differenti forme cliniche: la listeriosi non invasiva e la listeriosi invasiva. Tuttavia, non bisogna dimenticare che *L. monocytogenes* è presente nel tratto gastrointestinale di numerosi soggetti che non manifestano alcuna sindrome clinica: i **portatori asintomatici** [153]. Infatti colonizzando il tratto intestinale dei soggetti adulti può essere rilevato nelle feci del 5-10% della popolazione sana [74]. Non è ancora chiaro se la presenza del

microrganismo nel tratto intestinale di questi soggetti dipenda da una propagazione di *L. monocytogenes* 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, propionato, butirato), 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.

Nei soggetti adulti immunocompetenti (soggetti senza fattori predisponenti) a seguito dell'esposizione a cariche elevate, si osserva una forma di listeriosi **non invasiva**, che si manifesta come gastroenterite accompagnata da febbre, nausea, vomito e diarrea che possono protrarsi per 1-3 giorni fino a 1 settimana. Molto spesso l'infezione nell'adulto sano è asintomatica o caratterizzata da sintomi simil-influenzali e l'infezione è autolimitante [141; 89]. Il periodo di incubazione, dall'ingestione di alimenti contaminati all'inizio della listeriosi, è molto variabile e va da 1 giorno a 3 mesi [89]. 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 [127]. Purtroppo le forme di listeriosi gastroenterica sono sotto documentate [74] 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 *L. monocytogenes* dall'esame colturale delle feci [153]. 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) [153].

La **forma invasiva** si manifesta nella popolazione a rischio, come donne in stato di gravidanza, soggetti immunocompromessi e anziani. L'infezione degli organi target primari (fegato e milza) è efficacemente contenuta in un ospite immunocompetente, grazie alla risposta immunitaria cellulo-mediata, mentre in soggetti con sistema immunitario debilitato il microrganismo può raggiungere altri organi bersaglio tra cui cervello e placenta mediante la circolazione sanguigna avanzando verso la listeriosi sistemica nelle forme di setticemia (granulomatosi settica e forma tifoso-pneumonica), infezione localizzata nel cervello (forma meningoccefalica) o nell'unità feto-placentale (granulomatosi infantiseptica o listeriosi neonatale). Il periodo di incubazione del patogeno, prima che insorga la sintomatologia specifica, è molto lungo, tra i 30 e i 70 giorni fino a 3 mesi dal consumo di alimenti contaminati. Le manifestazioni cliniche della listeriosi invasiva sono essenzialmente a carico del sistema nervoso centrale e includono meningite, encefalite, meningoccefalite e setticemia, oppure forme di listeriosi viscerale, con sintomi settici e con compromissione del fegato, della milza e dei polmoni, nei quali si formano caratteristici granulomi miliari [4]. In casi più rari, *L. monocytogenes* può anche produrre una vasta gamma di infezioni localizzate; sono stati infatti riportati casi di congiuntivite, infezioni cutanee, linfadenite, ascessi epatici o cerebrali, colecistite, peritonite, ascesso splenico, pleurite, infezione comune, osteomielite, pericardite, miocardite, arterite, fascite necrotizzante e endoftalmite [4].

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. *L. monocytogenes* sembra essere responsabile di circa il 10% delle forme di meningite sviluppate a livello della popolazione [40].

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 [164; 40].

Le encefaliti sono poco comuni nell'uomo e coinvolgono principalmente il romboencefalo [164].

Nelle donne in gravidanza le capacità di avere un'efficace risposta cellula-mediata contro microrganismi patogeni intracellulari è deficiente per la ridotta produzione di INF- α e di IL-12 e TNF- α in presenza di elevati tassi di estradiolo. L'infezione intrauterina può essere acquisita durante tutte le fasi della gravidanza, ma generalmente si verifica tra la 16a e la 35a settimana di gestazione, quando l'immunità cellulare è più compromessa [4]. La listeriosi nelle gestanti o è asintomatica o si manifesta con una sintomatologia lieve, simile a quella influenzale [19; 94]. 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 [79]. 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 [85]. 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 [94; 153]. 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 sotto forma di meningite, dovuta alla trasmissione durante l'attraversamento del canale del parto, anche se sono stati descritti casi di listeriosi neonatale ad inizio tardivo in neonati con parto cesareo, attribuibili a trasmissione orizzontale da parte del personale ospedaliero [173]. Il tasso di mortalità in entrambi i tipi di listeriosi neonatale è molto elevato (15-50% inizio precoce e 10-20% inizio tardivo) e può portare a idrocefalo o ritardi motori nei neonati sopravvissuti [48; 93].

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 [94]. 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 [79; 153].

In generale, il tasso di ospedalizzazione legato ai casi di listeriosi invasiva è del 90% con una mortalità del 20-40%, anche in caso di corretta terapia e, soprattutto nei soggetti in cui l'infezione ha coinvolto il SNC, le sequele possono essere gravi e a lungo termine [25; 96]. Circa 33% dei casi clinici riguarda donne in gravidanza, che rappresentano circa il 60% di tutti i casi (uomini e donne) di infezione in soggetti tra 10-40 anni [157]. Anche gli

adulti sopra i 65 anni, sono a rischio, data la normale condizione di declino del sistema immunitario, il frequente l'uso di farmaci (es. antiacido) e lo stile di vita (alimentazione poco variata e ridotta attività fisica), che può portare ad un indebolimento delle difese immunitarie.

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 [127]. 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 *L. monocytogenes*, sfruttando il fatto che gli altri microrganismi non crescono a queste temperature [3; 94].

La diagnosi di listeriosi invasiva e delle forme associate alla gravidanza avviene attraverso l'isolamento di *L. monocytogenes* 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 [3; 85]. 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 [170]. 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 *L. monocytogenes* [3; 94].

1.2.1 Patogenesi

La listeriosi umana essendo considerata un'infezione prevalentemente a trasmissione alimentare la principale porta d'entrata di *L. monocytogenes* nell'ospite è rappresentata dal tratto gastrointestinale [132]. Altre possibili vie di infezione sono costituite da:

- trasmissione diretta attraverso la pelle, caratterizzata da rash cutanei di piogranulomatosi su mani e braccia, che possono essere osservati in allevatori e veterinari esposti a secrezioni genitali o feti, da casi di aborti spontanei in ruminanti;
- listeriosi nei ruminanti, in cui *L.monocytogenes*, veicolato da insilati contaminati, ha accesso al romboencefalo, attraverso i nervi craniali, mediante diffusione da una cellula all'altra, dopoinvasione locale dei nervi terminali in bocca, nasofaringe o occhi;
- trasmissione verticale trans-placentale nei casi di listeriosi materno-fetali, anche se l'infezione nella madre è principalmente acquisita attraverso alimenti contaminati [99].

Sono riportati casi di trasmissione in soggetti ospedalizzati a causa di materiale contaminato o tramite gli operatori sanitari [141]. Nel personale ostetrico (ma anche medici e veterinari) la listeriosi può costituire una 'malattia professionale', in quanto il liquido amniotico e il canale del parto possono presentare cariche elevatissime del batterio.

Il processo infettivo evolve in patologia quando il batterio attraversa la barriera intestinale diffonde per via ematica e linfatica raggiungendo inizialmente il fegato, in cui si moltiplica all'interno degli epatociti, e la milza, quindi sempre per via ematica raggiunge gli organi bersaglio secondari: cervello e placenta. Caratteristica di *L. monocytogenes* è proprio la sua capacità di superare le barriere dell'ospite (intestinale, emato-

encefalica, materno-fetale), unitamente alla capacità di sopravvivere ai meccanismi battericidi messi in atto dai macrofagi oltreché di penetrare, per la sua natura di patogeno intracellulare facoltativo, all'interno di cellule non necessariamente fagocitiche (epatociti, neuroni, ecc.) [105; 144].

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 [41]. La terapia antiacida assunta da alcuni soggetti e talvolta lo stesso potere tamponante di alcuni cibi, veicolo stesso di infezione, abbattendo temporaneamente l'acidità gastrica influiscono favorevolmente sulle possibilità di sopravvivenza del patogeno in questi distretti e sono fattori predisponenti affinché si manifesti la patologia o si instauri nell'individuo la condizione di portatore asintomatico [105; 144]. Abitualmente però *L. monocytogenes* ricorre ad altri meccanismi enzimatici. Un primo meccanismo adottato dal batterio in condizioni di pH molto basso è il ricorso al sistema della glutammato-decarbossilasi (GAD) che converte una molecola di acido glutammico esterna alla cellula in una di acido gamma-idrossibutirrico (GABA), utilizzando un suo protone interno. Il risultato finale è quello di impegnare un gran numero di protoni diminuendone la loro concentrazione intracellulare, alcalinizzando nel contempo il mezzo esterno considerata la minore acidità del GABA rispetto all'acido glutammico [125]. Il secondo meccanismo conosciuto, denominato BSH (Bile Salt Hydrolase, idrolisi dei sali biliari), è il sistema enzimatico grazie al quale *L. monocytogenes* è in grado di idrolizzare il legame ammidico dei sali biliari coniugati, liberando acidi biliari che hanno un potere emulsionante molto inferiore rispetto ai primi e di conseguenza un effetto batteriostatico e battericida molto più basso [125]. Superato lo stomaco e il primo tratto dell'intestino tenue, *L. monocytogenes* 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 [164; 136]. Se *L. monocytogenes* 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 viene traslocato al fegato, il suo primo organo [136]. 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 [164]. 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 [164; 136].

Tuttavia, se la proliferazione del patogeno a livello del fegato non viene controllata bene, come spesso accade nei soggetti immunocompromessi, la proliferazione di *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* 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 [164; 136] (Fig. 4).

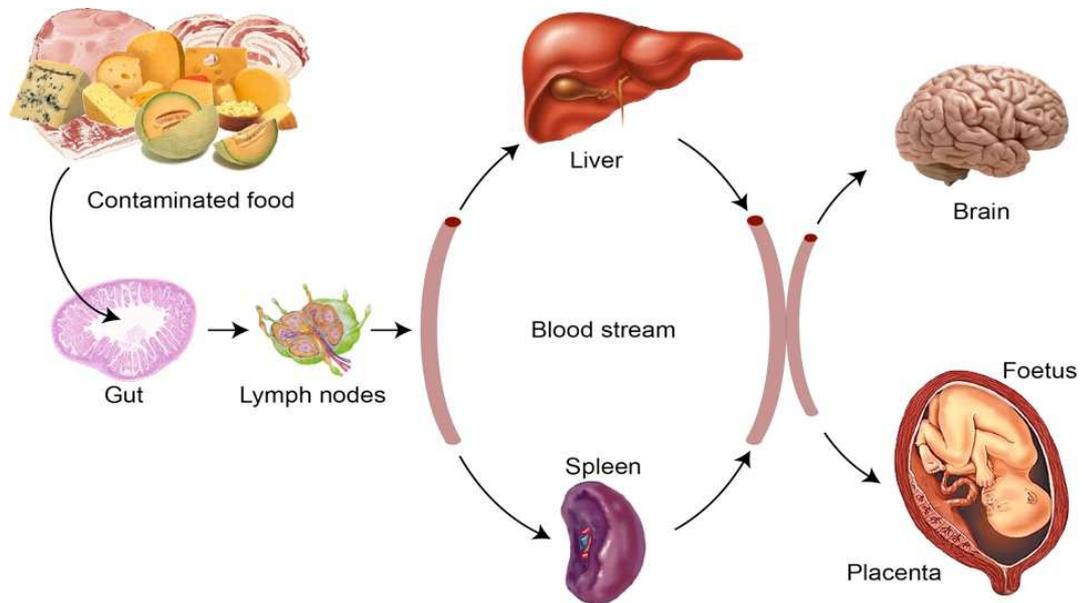


Figura 4: Modalità di diffusione dell'infezione da *L. monocytogenes* nell'organismo

1.2.2 Ciclo replicativo

L. monocytogenes è un patogeno intracellulare facoltativo, per questo è in grado di sopravvivere e replicarsi sia come saprofita ambientale che come patogeno intracellulare [70; 53] (Fig. 5). Come patogeno *L. monocytogenes* induce la propria internalizzazione in diversi tipi di cellule: 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 [170]. Mentre l'internalizzazione nei macrofagi avviene spontaneamente, l'ingresso nelle cellule non fagocitarie dell'ospite è promossa da due proteine di superficie, le

internaline A (InlA) e B (InlB). Esse sono codificate dai geni *InlA* e *InlB* e attraverso il dominio LRR (*leucine-rich repeat*), interagiscono con specifici recettori di superficie della cellula ospite, rispettivamente *E-caderina* e *Hepatocyte Growth Factor Receptor* (met/HGF-R), innescando una cascata del segnale intracellulare che induce la riorganizzazione del citoscheletro al fine di promuovere la fagocitosi da parte della cellula ospite, con formazione di un vacuolo fagocitico primario [17].

InlA si lega selettivamente al solo recettore E-caderina delle cellule epiteliali umane in cui ne attiva la fagocitosi, mentre InlB interviene nell'invasione di un maggior numero di cellule, in particolare epatociti e fibroblasti, attraverso l'interazione con almeno tre recettori conosciuti *Met*, *gC1qR* e glicosamminoglicani. Tra questi il più importante è sicuramente *Met* poiché coinvolto nell'interazione con gli epatociti, cellule del primo organo bersaglio in corso di listeriosi [34]. Un'altra importante proteina è la p60 (*Invasion Associated Protein*) che si ritiene sia anch'essa coinvolta nel meccanismo di adesione del batterio alle cellule eucariotiche oltreché nella fase tardiva della divisione cellulare, per la sua attività idrolasica nei confronti della mureina [164].

L. monocytogenes 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. La permanenza della *L. monocytogenes* all'interno del fagosoma ha una durata media non superiore a 30 minuti, durante i quali si attiva per impedire l'azione battericida della cellula ospite grazie alla sintesi di altri fattori di virulenza volti alla disgregazione del fagosoma stesso. A questo scopo il batterio secerne listeriolisina O (LLO) e due fosfolipasi:

Fosfatidilinositolo-fosfolipasi C (PlcA) e Fosfatidilcolina-fosfolipasi C (PlcB) [34].

La listeriolisina O, codificata dal gene *hly*, rappresenta il principale determinante di virulenza. Essa è una esotossina citolitica appartenente alla classe delle proteine tiolo-attivate che attaccandosi alla membrana del fagosoma induce in essa la formazione di pori, con conseguente alterazione degli equilibri ionici e successiva disgregazione del fagolisosoma e liberazione del batterio nel citoplasma. La tossina LLO si attiva con le condizioni di acidità del fagosoma nell'intervallo di pH 4,5-6,5 e, una volta avvenuta la rottura di quest'ultimo, viene inattivata dal pH neutro del citoplasma [34].

La PlcA, codificata dal gene *plcA*, interviene nella lisi della membrana singola del fagolisosoma primario, cioè originato a seguito della penetrazione diretta del microrganismo nella cellula ospite, mentre la PlcB contribuisce alla lisi del vacuolo a membrana doppia che si forma nel passaggio della *L. monocytogenes* dalla cellula ospite alla cellula adiacente nel meccanismo di diffusione intercellulare di cui si parlerà più avanti. All'interno del citoplasma della cellula ospite la *L. monocytogenes* si moltiplica attivamente e sintetizza altri fattori di virulenza indispensabili per il completamento del ciclo infettivo [34]. Tra questi induce l'espressione di una proteina responsabile della motilità intracellulare 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 [164; 34]. *L. monocytogenes* infatti ottiene la sua forza propulsiva al proprio movimento dal processo di polimerizzazione polarizzata dei filamenti di actina della cellula ospite indotta da ActA. Quando il batterio raggiunge la periferia della cellula,

protrude con strutture simili a pseudopodi chiamate ‘listeriopodi’ e invade la cellula vicina. Infatti, estroflette la membrana della cellula ospite e inflette quella della cellula adiacente, penetrandovi e dando luogo ad un vacuolo secondario a doppia membrana. Tale processo è aiutato da InlC, che rilassa le tensioni giunturali attraverso l’interazione con TUBA, un regolatore del complesso del nodo stretto. La fagocitosi di tali strutture da parte delle cellule adiacenti provoca la formazione di un vacuolo a doppia membrana, da cui sfugge mediante LLO e fosfolipasi, in questo caso codificata da plcB, iniziando un nuovo ciclo di proliferazione [134; 164]. L’abilità del patogeno consiste nel disseminarsi passando da una cellula all’altra attraverso il citoplasma, senza venire mai in contatto con i liquidi extracellulari e quindi sfuggendo al sistema immunitario dell’ospite [147].

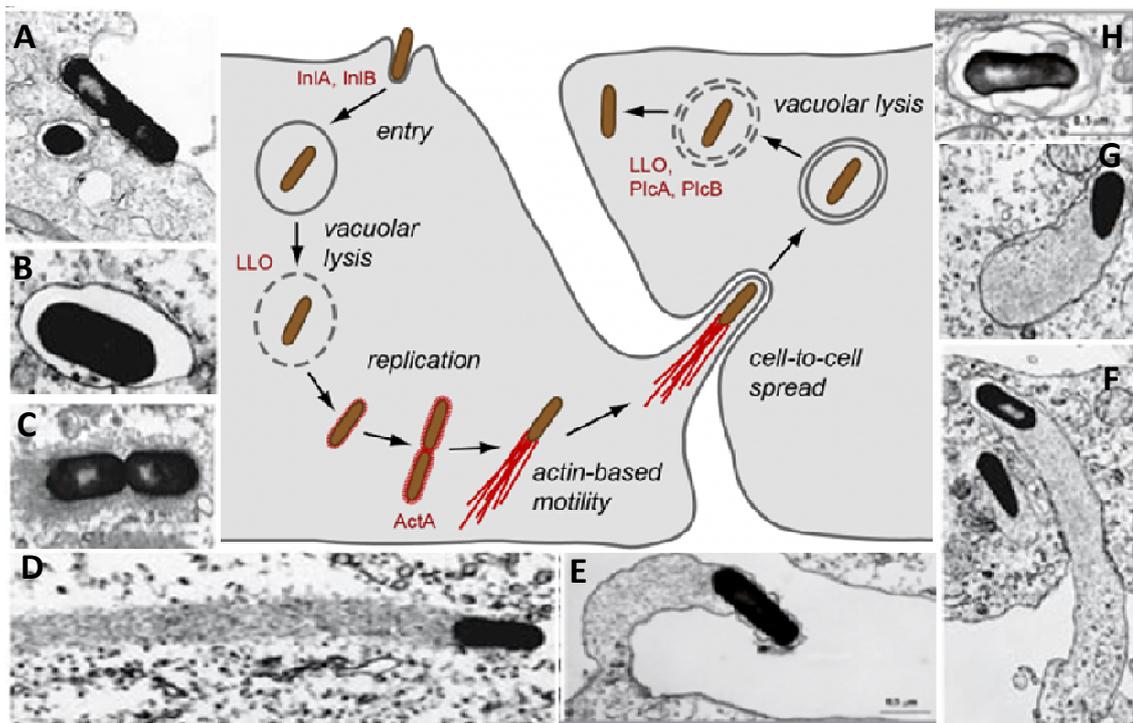


Figura 5: Meccanismo di infezione cellulare di *L. monocytogenes*: (A, B) ingresso e formazione del fagosoma, (C, D) divisione e movimento intracellulare, (E, F) passaggio alla cellula adiacente, (G, H) formazione e lisi del vacuolo secondario

1.2.3 Principali determinanti di virulenza e loro regolazione

Ciascuna fase del meccanismo di patogenesi di *L. monocytogenes* (invasione, lisi dei fagosomi, crescita, mobilità intracellulare e diffusione alle cellule limitrofe) è mediata da fattori di virulenza codificati da specifici geni raggruppati in unico cluster di 9 kb denominato *Pathogenicity Island-1* (LIPI-1 o *prfA* cluster) localizzato tra i geni housekeeping *prs* (phosphoribosyl synthetase) e *ldh* (lactate dehydrogenase). In tale cluster sono compresi 6 geni *prfA*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *mpl* e *actA* [164, 146]. *L. ivanovii* possiede un cluster simile, mentre *L. seeligeri*, specie non patogena per l'uomo, possiede un cluster più complesso con 5 geni addizionali (Fig. 6). Il cluster di *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* è regolato a monte dal fattore trascrizionale *prfA*, che agisce positivamente su *hly* (codificante per listeriolisina LLO), *plcA* e *plcB* (codificanti due fosfolipasi). Il gene *plcA* codifica una fosfolipasi C fosfatidilinositolo specifica, mentre *plcB* una fosfolipasi C fosfatidilcolina specifica, la quale necessita per la sua corretta maturazione della metalloproteasi codificata dal gene *mpl* (presente nello stesso cluster). Anche *actA*, implicato nel processo di polimerizzazione dell'actina necessaria per il movimento intracellulare nella cellula ospite, fa parte del cluster LIPI-1. Le proteine codificate da *actA*, *mpl* e *plcB*, permettono la diffusione da una cellula all'altra.

Lo studio del genoma di *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* ha permesso di identificare altri geni di virulenza non localizzati nell'isola di patogenicità LIPI-1, tra cui l'operone *inlAB* (Internalinmediated Listeria invasion), che codifica per le internaline A e B e i monocistroni *inlC* e *hpt*, fondamentali per l'invasione della cellula dell'ospite nei mammiferi. Inoltre, è stato identificato il gene *iap* (invasion associated protein), codificante la proteina

p60, associata all'invasione cellulare ed è cruciale nel mantenimento del fenotipo invasivo in fibroblasti, epatociti e macrofagi nel modello murino. Inoltre, *iap* caratterizzato da un elevato peso molecolare (60 kDa) è determinante per la corretta divisione cellulare data la sua attività di mureina idrolasi [22]. Un altro gene, presente in *L.monocytogenes* e assente in *L.innocua*, è il gene *aut* che codifica per la proteina di superficie Auto, contenente, un dominio Nterminale di un'autolisina e un dominio C-terminale di ancoraggio alla parete cellulare. L'unica proteina coinvolta nell'adesione del batterio alle cellule ospiti, senza promuoverne l'aggancio, è l'autolisina Ami, di 917 aminoacidi, con attività catalitica nella parte N-terminale della molecola [107]. Tale proteina interviene nel legame con le cellule epiteliali e gli epatociti, mentre il dominio C-terminale è responsabile delle proprietà di adesione della proteina alle cellule. Il gene *aut* e *ami*, come *iap* e altre autolisine di superficie, è espresso indipendentemente dal regolatore centrale PrfA.

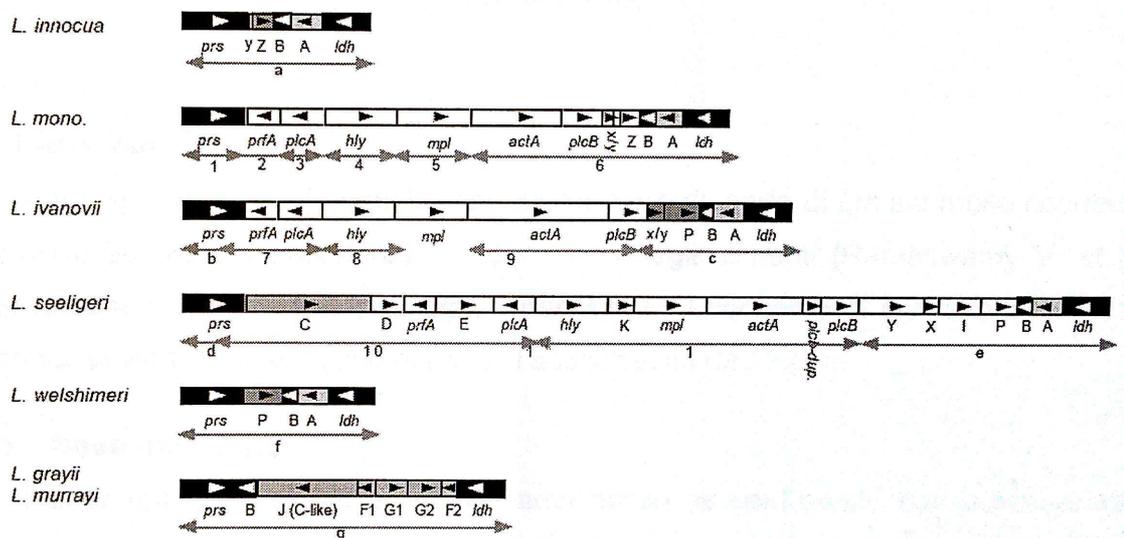


Figura 6: Il cluster di virulenza in *Listeria* spp. compreso tra i geni housekeeping *prs* e *ldh*.

In *L. ivanovii* è stata individuata una seconda isola di patogenicità di 22 Kb (LIPI-2), composta da geni codificanti diverse internaline, e dal gene *smcL*, che codifica la sfingomielinasi, responsabile di una forte emolisi bizonale su agar sangue e della distruzione dei fagosomi. Tale cluster di virulenza è determinante nel tropismo patogenetico verso i ruminanti, in cui *L. ivanovii* causa setticemia e aborto. Rispetto alle specie patogene, le non patogene hanno perso LIPI-1 (*L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*) o posseggono un cluster ridotto (*L. innocua*, *L. welshimeri*) [28]. Tuttavia, sono stati riportati ceppi atipici caratterizzati dalla presenza/assenza di uno specifico pattern di geni di virulenza. Ad esempio, mentre *L. innocua*, non patogena per l'uomo, è tipicamente non emolitica e manca di LIPI-1, un numero ristretto di ceppi è emolitico e presenta sia tale cluster che *inlA*. Inoltre, sono stati riportati ceppi non emolitici di *L. seeligeri* privi del cluster LIPI-1, anche se in molti ceppi della specie è presente, nonostante tipicamente avirulenti [38]. Tali ceppi atipici, sebbene complichino l'identificazione tassonomica, potrebbero contribuire a comprendere l'evoluzione dei determinanti di virulenza alla base della filogenesi del genere *Listeria*.

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 [53]. 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 esoso-fosfati) la sua attività è incentivata. Dunque PrfA, rispondendo a stimoli extracellulari promuove un rapido adattamento di *L. monocytogenes* alla sua localizzazione contingente, determinando così la conversione di *L. monocytogenes* da saprofita ambientale a patogeno [37].

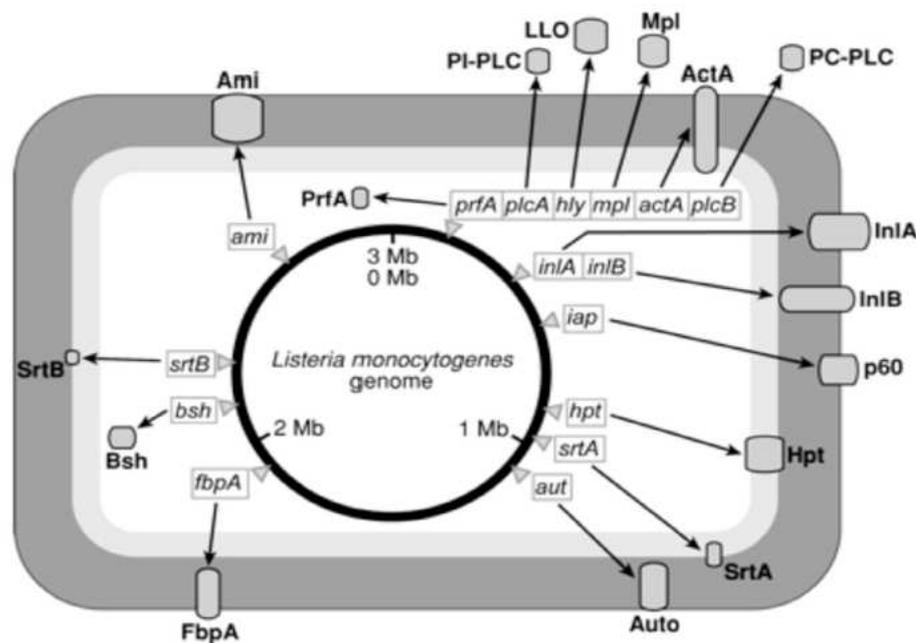


Figura 7: Rappresentazione schematica della cellula di *L. monocytogenes*

1.2.4 Terapia e Antibiotico-Resistenza

Il trattamento antibiotico di scelta per la cura della listeriosi prevede la somministrazione per via endovenosa di β -lattami, come 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 [3, 19]. Per questa categoria di pazienti si tende a utilizzare l'eritromicina e vancomicina. Anche il trattamento con sulfamidico associato al trimetoprim è efficace nei confronti di *L. monocytogenes* e viene normalmente utilizzato per i pazienti allergici alla penicillina [32]. Anche linezolid, menoperem e rinfapicina si sono dimostrati efficaci nel trattamento della listeriosi [117; 109].

La rinfapicina grazie alla sua capacità di penetrare la barriera emato-encefalica (BEE) è spesso indicata in associazione per l'eradicazione dell'infezione in pazienti immunocompromessi [32].

La risposta di *L. monocytogenes* 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 [153]. Tuttavia la terapia antimicrobica per la listeriosi non è pienamente soddisfacente, perché gli ospiti immunocompromessi presentano maggiori difficoltà rispetto agli ospiti immunocompetenti.

Studi della letteratura mostrano che l'utilizzo in monoterapia può associarsi a casi di resistenza [75].

Il Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (CA-SFM, 2010) e il National Reference Center for Listeria (NRCL) hanno riportato che la *L. monocytogenes* responsabile di infezioni umane mostra una naturale resistenza ai fluorochinoloni di prima generazione e alle cefalosporine, specialmente di terza e quarta generazione, fosfomicina, oxacillina, lincosamidi, [62] tetracicline, minociclina e streptomidine [26; 56; 156].

Lo sviluppo e la selezione di ceppi resistenti può essere dovuto ad una capacità innata o acquisita (AMR) del batterio.

La Resistenza naturale è dovuta alla presenza di geni, tra i quali *tet*, *tet(M)*, *tet(S)*, *aad*, *cat*, *erm*, *dfrD*, individuati come responsabili della resistenza a tetracicline, streptomina, cloranfenicolo, macrolidi e trimetoprim rispettivamente (70). La resistenza ai Fluorochinoloni è correlata alla mutazioni dei geni *gyrA* e *parC* che codificano subunità di DNA girasi, topoisomerasi II e topoisomerasi IV, target dei fluorochinoloni. A questi si accompagna la sovra-espressione del gene *lde* a cui si deve lo sviluppo di una pompa ad efflusso che espelle l'antibiotico, fluorochinolone o ciprofloxacina, [60; 97] impedendone il raggiungimento della minima concentrazione efficace.

La resistenza acquisita è dovuta alla capacità di sviluppare, attraverso plasmidi o trasposomi, materiale genetico esogeno contenente geni di resistenza a uno o più antimicrobica [88; 32]. Il plasmide PI501, che conferisce resistenza a cloranfenicolo, macrolidi, lincosamidi e streptogramine, è stato il primo ad essere identificato come trasferibile tra le varie specie di *Listeria* [130]. È stato inoltre ipotizzato che *L. innocua* possa costituire una sorta di reservoir per i geni di resistenza che poi sono acquisiti da *L. monocytogenes* [14]. Conoscere il pattern di sensibilità tra *L. monocytogenes* e *L. innocua* è importante in virtù del fatto che spesso entrambe le specie si trovano negli stessi cibi o negli stessi ambienti di lavorazione dei cibi [61].

A conferma di questo, recentemente, è stato individuato nella *L. innocua* un plasmide (pDB2011), responsabile della resistenza al trimetoprim e codificato dal gene *dfrD*, la cui sequenza genica è identica a quella del gene *dfrD* isolato in *L. monocytogenes* [15].

Il trasferimento [13]: *L. monocytogenes* è in grado di acquisire geni di resistenza principalmente da enterococchi e streptococchi all'interno del tratto gastrointestinale. Anche la capacità di sopravvivere allo stress ossidativo, probabilmente come conseguenza dell'interruzione del ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA), influisce positivamente sull'antibiotico resistenza [88; 32].

L'utilizzo indiscriminato di antisettici e disinfettanti nelle industrie alimentari può favorire la selezione di ceppi resistenti, suggerendo che l'attività antibatterica di tali composti può avvenire a livello dello stesso sito target [57]. Sebbene non sia stata dimostrata l'associazione tra l'esposizione delle colture batteriche a concentrazioni sub-letali di disinfettanti e le variazioni nella suscettibilità agli antibiotici, l'uso frequente di composti dell'ammonio quaternario nelle industrie alimentari, può favorire la selezione di ceppi antibiotico-resistenti, determinando la sopravvivenza di *L. monocytogenes* negli ambienti di produzione [88; 32]. Sebbene il fenomeno dell'antibiotico resistenza sia piuttosto marginale è comunque in costante aumento. Nelle ultime decadi si è registrata una crescita dell'incidenza dei casi di resistenza alle tetracicline, fluorochinoloni, cloranfenicolo, macrolidi e trimetropin.

L'evoluzione temporale della resistenza alle eritromicine, cloranfenicolo, ciprofloxacina e tetraciclina è stata analizzata in un ampio studio Francese per il quale sono stati analizzati 4816 casi clinici interessati tra il 1926 e il 2007. Lo studio ha documentato una resistenza nel 1,27% dei casi maggiore per tetracicline e fluorochinoloni [110; 88].

La necessità di monitorare lo sviluppo dell'antibiotico resistenza e la reale efficacia del trattamento antibiotico nella listeriosi assume un'importanza primaria in considerazione sia dell'elevata mortalità associata alla patologia

[62] che dell'aumento dell'incidenza di listeriosi invasiva in pazienti immunocompromessi [3; 158; 88].

L'antibiotico resistenza costituisce un importante problema per la salute pubblica a livello mondiale poiché i continui spostamenti della popolazione favoriscono la diffusione di ceppi resistenti nei vari Paesi e Continenti [44]. A conferma di questo studi europei ed americani evidenziano la presenza nei diversi continenti di uno stesso profilo di resistenza verso eritromicine, rifampicina, trimetoprim-sulfametossazolo ed in particolare alle tetracicline [169; 67; 156].

Anche i dati ottenuti in Italia dalla dottoressa Cocuzza tra il 2008 e il 2010 sono perfettamente coerenti con quelli riscontrati in altri studi effettuati in diverse aree geografiche dell'Europa.

Cocuzza e colleghi hanno riportato i risultati di 96 casi di listeriosi umana, individuati tra il 2008 e il 2010, per i quali sono stati effettuati test di sensibilità su 15 antibiotici. Lo studio evidenziava che tutti i ceppi erano sensibili alla penicillina G, meropenem e eritromicina in accordo con i punti definiti dal EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [101].

Lo studio di Barbosa condotto in Portogallo su ceppi isolati da prelievi umani (95) e alimentari (353) dal 2003 al 2007, ha mostrato una resistenza a nitrofurantoina, ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina, e rifampicina in una percentuale rispettivamente del 28.3% e 20.0%.

Kovacevic in uno studio condotto in Canada su ceppi isolati da alimenti e ambienti di lavorazione, ha riportato resistenza a cefoxitina(98%), ciprofloxacina (7%), clindamicina (33%), e tetracicline (6%). Lo studio ha inoltre documentato una ridotta sensibilità a linezolid (6%), rifampicina (2%), streptomina (6%), ciprofloxacina (67%), e clindamicina (65%) in accordo con le linee guida del CLSI [88].

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

Moreno e colleghi hanno valutato ceppi responsabili di infezioni sia in maiali che nell'uomo isolati nei mattatoi. Lo studio evidenzia un'elevata resistenza alla clindamicina, daptomicina, e fluorochinolone e una notevole resistenza naturale alle cefalosporine di terza e quarta generazione. Ceppi di *L. monocytogenes* e *L. innocua* sono risultati resistenti alla clindamicina e oxacillina. Mentre risultavano sensibili agli antibiotici normalmente usati nel trattamento della listeriosi penicillina, gentamicina, ampicillina e trimetropimsulfametossisazolo [108].

1.2.5 Tipizzazione molecolare di *L.monocytogenes*

Numerose tecniche di tipizzazione sono state sviluppate a supporto degli studi epidemiologici e per la caratterizzazione di *L. monocytogenes*, tra cui metodi fenotipici (es. sierotipizzazione, *multilocus enzyme electrophoresis MLEE*) e tecniche molecolari basate su PCR e/o restrizione enzimatica (es. *multiplex-PCR*, *repetitive element PCR*, *Random Amplified Polymorphic DNA*, *ribotyping*, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) o metodi più complessi di analisi di sequenza (es. *Multilocus Sequence Typing*, *Single Nucleotide Polymorphism typing* e *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*) [121].

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 alimentari sospetti e di risalire all'origine della contaminazione del prodotto lungo la catena alimentare [41; 173].

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 [80].

Tra i metodi fenotipici più largamente utilizzati per la differenziazione degli isolati della stessa specie batterica rientra la sierotipizzazione, una tecnica classica che sfrutta il differente corredo degli antigeni di superficie degli isolati che può essere rilevato grazie ad antisieri [173]. In base all'antigene somatico (O) e flagellare (H), è possibile classificare questa specie in 13 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) [41]. Tale classificazione prevede test di agglutinazione basati sulla reazione antigene-anticorpo tra 15 antigeni somatici (O sottotipi IXV) e 5 flagellari (H sottotipi A-E) con specifici antisieri [148]. I ceppi implicati nei casi di infezione umana appartengono prevalentemente ai sierotipi 1/2a, 1/2b, 4b e 4c [104]. 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 [80]. 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 [173]. La sierotipizzazione viene utilizzata prevalentemente per uno screening immediato e rapido dei gruppi di ceppi isolati durante un sospetto *outbreak* permettendo di 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 [69].

Un'ulteriore tecnica di genotipizzazione, basata su *multiplex-PCR*, è stata messa a punto per semplificare tale identificazione. Essa distingue i ceppi in 4 sierogruppi associati ai sierotipi: Gruppo 1 (sierotipi 1/2a e 3a), Gruppo 2 (1/2c e 3c), Gruppo 3 (1/2b, 3b e 7) e Gruppo 4 (4b, 4d e 4e)

[131]. Tuttavia, non distingue i sierotipi 1/2a da 3a, 1/2c da 3c, 1/2b da 3b e 7, o 4b da 4d e 4e, né separa 4a e 4c dalle altre specie di *Listeria* spp. Essendo i sierotipi 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 estremamente rari, tale limitazione è irrilevante dal punto di vista epidemiologico [76].

Tra le tecniche di tipizzazione fenotipica ricordiamo anche la MLEE, *Multilocus enzyme electrophoresis* che permette di differenziare ceppi di *L. monocytogenes* sfruttando la mobilità elettroforetica di enzimi costitutivi, ciascuno dei quali è presente in questa specie batterica in diverse varianti. Questa tecnica 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 [80].

L'utilizzo di test di suscettibilità agli antimicrobici per la tipizzazione intraspecifica di *L. monocytogenes* ha avuto una limitata applicabilità, dal momento che questo batterio risulta sensibile agli antibiotici in maniera abbastanza uniforme [69].

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 [173].

La PFGE è il metodo *gold standard* per la tipizzazione di *L. monocytogenes*. 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). Gli enzimi di restrizione tagliano "infrequentemente" il DNA producendo frammenti di DNA cromosomico di elevato peso molecolare che, sottoposti a elettroforesi in campo pulsato, vengono separati attraverso l'influenza di due campi elettrici, attivati

alternativamente secondo direttrici quasi perpendicolari, permettendo così un continuo riorientamento dei frammenti di DNA. I profili di restrizione così ottenuti presentano un numero limitato di bande risultando di facile lettura e interpretazione e vengono classificati in diversi pulsotipi [41; 80]. 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 *L. monocytogenes* [80].

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) [173]. 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 [80]. Il ribotyping ha un potere discriminante paragonabile all'MLEE ed è stato frequentemente utilizzato per la tipizzazione di *L. monocytogenes*. 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 [41; 80].

Ulteriori metodiche tra cui la AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) sono in grado di identificare le caratteristiche molecolari

dei diversi ceppi batterici, valutandone le correlazioni genetiche [121; 35]. Essa è largamente utilizzata, anche come tecnica di routine di laboratorio, soprattutto per l'elevato potere discriminante e la riproducibilità. Inoltre, non necessita di informazioni relative alle sequenze del DNA target per la costruzione di primer specifici.

Il sequenziamento del DNA a livello di uno o più geni specifici è sempre più utilizzato per la tipizzazione intraspecifica di *L. monocytogenes* [41]. 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 [80]. Questo tipo di analisi sfrutta la presenza in questi loci di geni *housekeeping* (MLST) o geni di virulenza (MVLST) caratterizzati da un alto polimorfismo [173]. L'MLST e MVLST sono utilizzate per la subtipizzazione di *L. monocytogenes*, 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 dati in cui sono stati inseriti tutti i *Sequence Type* di *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* e negli studi filogenetici [41].

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 [29]. 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 subtipizzazione 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 [103].

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 [38] e altri hanno incluso i geni 16S rRNA [87]. Altri ancora hanno utilizzato i soli geni di virulenza per la subtipizzazione di alcuni patogeni come *L. monocytogenes* [182] rinominando la MLST 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 [28; 98; 166] può essere riconducibile al fatto che i geni di virulenza possono essere pleiotropici, incrementando sia la trasmissione che l'abilità di causare malattie invasive [154]. 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 (EC), ossia per ogni EC corrisponde un unico *Virulence Type* (VT) [28; 98; 166]. 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 [165]. Esempi sono la *Cluster Regularly Interspaced Short*

Palindromic Repeats (CRISPRs) per *Salmonella* [98, 46] e *comK prophage junction fragments* in *L. monocytogenes* [165].

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 [29].

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 [129; 91].

1.3 Risposta immunitaria dell'ospite

Dopo l'ingestione di alimenti contaminati, *L. monocytogenes* invade la mucosa gastrointestinale e, attraverso il flusso sanguigno, raggiunge fegato, milza e talora il sistema nervoso centrale. Il patogeno è in grado di infettare sia fagociti (monociti, neutrofili e macrofagi), sfruttando passivamente la loro capacità di fagocitosi, che cellule non fagocitiche mediante proteine di invasione. Successivamente, si libera nel citoplasma in cui moltiplica rapidamente per poi invadere le cellule vicine. Tale strategia, tipica dei patogeni intracellulari, evita il contatto diretto con il sistema del complemento e rende inefficace la risposta umorale. Di conseguenza, in un ospite immunocompetente, la risposta innata (aspecifica, non adattativa) è fondamentale, soprattutto nelle prime fasi

dell'infezione [99]. Essa è attivata da recettori (PRR) che riconoscono strutture molecolari specifiche del patogeno (PAMP). Quando *L. monocytogenes* viene inglobata dai macrofagi, questi producono nel sito di infezione un fattore di incremento della monocitopoiesi (FIM). Il FIM viene veicolato al midollo osseo dove stimola la produzione di macrofagi. L'infezione dei macrofagi stimola la secrezione di citochine, tra cui le interleuchine IL-1, IL6, IL-12 e IL-18, e chemochine (MCP-1), che attivano e richiamano i neutrofili. Essi rappresentano i polimorfonucleati più abbondanti tra le cellule bianche del sangue e, in risposta all'infezione, lasciano il flusso sanguigno per migrare verso il sito di infiammazione; la chemotassi dei neutrofili è provocata da IL-8. Sono, inoltre, coinvolti i macrofagi, che si differenziano nei tessuti dai monociti presenti nel sangue. Essi sono attratti nei loci di infezione da chemochine e sono in grado di eliminare i patogeni mediante fagocitosi. Sono attivati soprattutto da IFN- γ e TNF- α prodotti principalmente da linfociti T e cellule natural killer (NK). Nella risposta innata, un ruolo determinante è svolto dalle cellule NK che rilasciano perforine e granzimi che inducono apoptosi delle cellule bersaglio. Esse inoltre secernono le citochine IFN- γ e TNF- α che a loro volta aumentano l'attività dei macrofagi. La risposta innata, pur essendo determinante, non è sufficiente per controllare l'infezione. Infatti, circa il 90% dei batteri presenti negli epatociti è ucciso nelle prime 24 ore dai neutrofili; la restante parte internalizza e può replicare; oppure *L. monocytogenes* sopravvive all'interno di una parte dei macrofagi.

Nelle fasi successive, quindi, la risposta del sistema immunitario dell'ospite è di tipo cellulo-mediata (specifico, adattativa). Essa è cruciale per la completa eliminazione di *L. monocytogenes* e per l'acquisizione di resistenza. In particolare, l'iniziale produzione di IL-12 da parte dei macrofagi e di IFN- γ da parte delle cellule NK, spinge i linfociti T CD4

(linfociti T helper, TH) a differenziarsi in linfociti TH1 (da precursori TH0), che a loro volta producono IFN- γ e IL-2 attivando l'immunità cellulare. A tale attivazione delle cellule T CD4, segue l'espansione di linfociti T citotossici CD8, in grado di portare a morte per apoptosi le cellule infette. IL2 è la citochina clonale delle T cell. L'IL2 inoltre può attivare le cellule NKT e i CD8 per lisare le cellule infettate rendendo accessibile agli anticorpi le proteine della *L. monocytogenes*. Inoltre, componenti batteriche (LLO) rilasciate nel citoplasma della cellula ospite vengono processate e complessate con molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC1) ed esposte sulla superficie cellulare delle cellule dendritiche. Ciò consente ai linfociti T CD8+ di riconoscere e lisare le cellule infette e, allo stesso tempo di attivare altre cellule T CD4+, che stimolano la produzione di IFN γ e IL-2. La risposta delle cellule T raggiunge il picco entro 4–5 giorni dall'infezione e una volta eliminati gli antigeni batterici, le cellule T CD8 vanno incontro ad apoptosi. Tuttavia, una parte di esse si differenzia in linfociti T CD8 di memoria che persistono per un lungo periodo di tempo [36; 174].

Quindi, mentre la risposta innata è importante nelle fasi iniziali dell'infezione, la risposta specifica mediata dalle cellule T (immunità cellulo-mediata) è determinante per la clearance del patogeno e rappresenta la difesa principale dell'ospite, riuscendo ad eliminare anche le cellule che evadono da neutrofili e macrofagi [167].

Le cellule T CD8 giocano un ruolo cruciale nel controllo e nell'eradicazione di patogeni intracellulari. Pertanto qualsiasi condizione patologica a carico di tali cellule peggiora il decorso della listeriosi.

In seguito alla presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche, le cellule T CD8 naive antigene-specifiche subiscono una massiccia proliferazione numerica (espansione), per cui il numero delle

cellule T si espande di 10.000 volte. Successivamente, le cellule T CD8 acquisiscono funzioni effettrici (1° risposta effettrice) come l'attività citolitica e la capacità di produrre citochine. Dopo il picco di espansione, le cellule effettrici T CD8 diminuiscono rapidamente in numero, con conseguente morte del 90-95% delle cellule T effettrici (Contrazione). Il 5-10% delle cellule che sopravvivono alla fase di contrazione iniziale, costituiscono il pool di cellule T CD8 di memoria primaria (1° risposta di memoria). Le restanti cellule T CD8 di memoria antigene-specifica garantiscono una lunga protezione immunitaria dalla reinfezione [31] (Fig. 8).

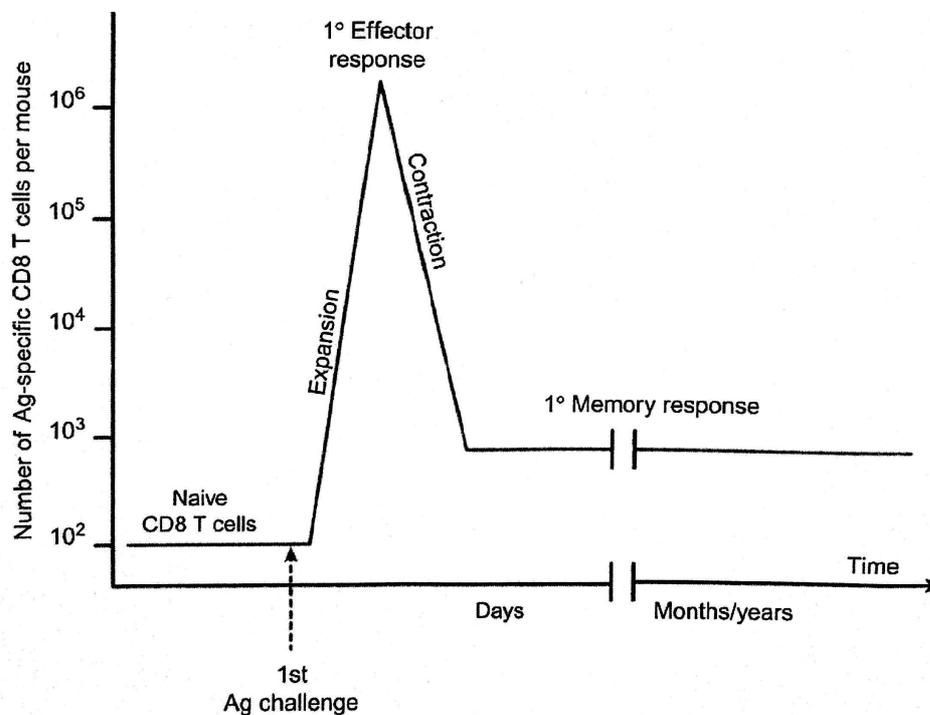


Figura 8: Cinetica della risposta delle cellule T CD8 in seguito ad infezione da *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes è stato a lungo utilizzato come modello di riferimento per lo studio dei microrganismi intracellulari, soprattutto per esaminare le interazioni ospite-patogeno e il meccanismo di stimolazione della risposta immunitaria. L'infezione di topi di laboratorio con *L. monocytogenes* ha

permesso di studiare ogni fase della risposta delle cellule T CD8 all'infezione (risposta primaria delle cellule T, generazione di cellule T CD8 di memoria, mantenimento, funzionalità e diversificazione) fornendo una maggiore comprensione sul funzionamento del sistema immunitario di fondamentale importanza per lo sviluppo di strategie di vaccinazione efficaci per la protezione contro gli agenti patogeni [81; 31]. Diversi studi circa possibili target terapeutici valutano con attenzione il ruolo specifico svolto da alcune citochine importanti nei meccanismi di attivazione e stimolazione dell'espansione clonale di linfociti T [81].

1.4 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia della listeriosi

La listeriosi è definita dall'Oms una malattia relativamente rara se confrontate con altre zoonosi, ma preoccupante perché notoriamente associata a un elevato tasso di mortalità soprattutto in soggetti vulnerabili come donne in gravidanza, neonati, anziani e pazienti immunocompromessi. Secondo i dati pubblicati nel rapporto Oms “Who estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015”, l'infezione è responsabile, globalmente, di circa 14.000 casi di malattia e 3000 decessi l'anno. La listeriosi rappresenta anche la terza causa di meningite batterica dopo *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* [6]

L. monocytogenes viene classificato come un patogeno emergente ed 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% [73; 118]. La sua frequenza 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 [118].

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. Essi si basano 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 [144]. 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, che contatta regolarmente i diversi laboratori per identificare tutti i casi di listeriosi confermati dall'analisi colturale [30].

È importante ricordare che in qualsiasi sistema di sorveglianza si tende a sottostimare l'incidenza della patologia [102] (Fig. 9). 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 [8].

Il risultato è una perdita di casi rilevati a ogni step del processo di segnalazione. 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 [30].



Figura9: 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 [151]. 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 [73; 52; 65] (Fig 10).

Nel 2014, *FoodNet*, il sistema di sorveglianza per le tossinfezioni alimentari statunitense a cui collaborano il *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 10 dipartimenti sanitari statali, il Dipartimento statunitense per l' Agricoltura e *Food Safety and Inspection Service* (USDA-FSIS), e la *Food and Drug Administration* (FDA) per la sicurezza alimentare, ha riportato 116 casi confermati di listeriosi umana, con un' incidenza media di 0,24 casi per 100.000 abitanti e un tasso di letalità del 15%. Sono state registrate 106 ospedalizzazioni e 17 morti di cui 2 aborti. I soggetti maggiormente coinvolti sono stati persone di età ≥ 65 anni e donne in gravidanza. [52]

IL CDC stima che negli USA ogni anno si verificano in media 1600 casi di malattia, con più di 1.500 ricoveri e 260 morti dovuti alla listeriosi [176].

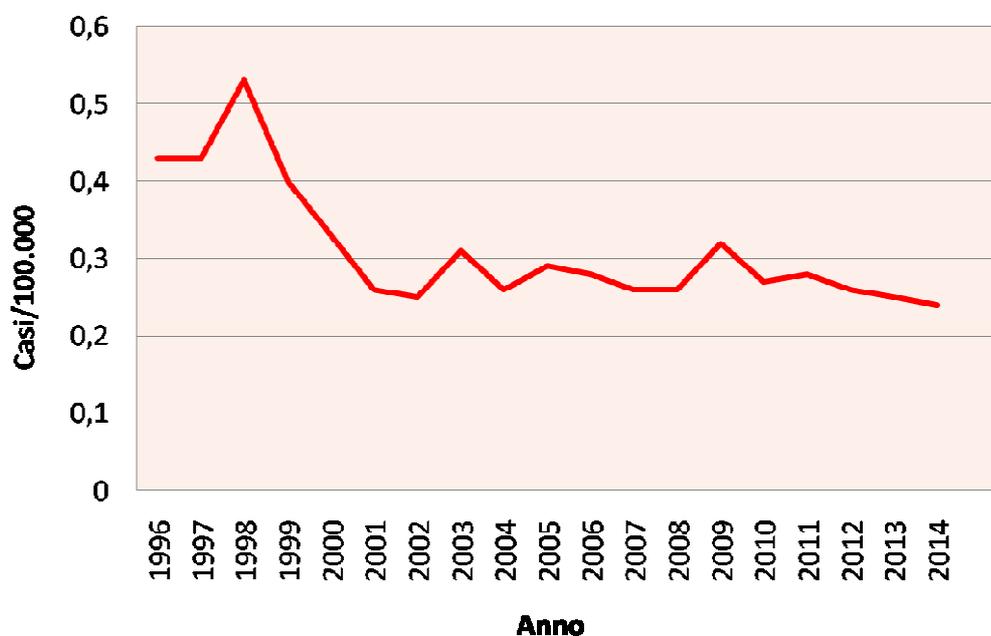


Figura 10: Incidenza della listeriosi negli USA dal 1996 al 2014

Anche se non vi è alcun obbligo di segnalazione sono stati condotti degli studi epidemiologici in Cina e Taiwan. In Cina, il periodo considerato dal 1964 al 2010 ha riportato un totale di 147 casi clinici di *L. monocytogenes* di cui 68 (46%) erano casi di sepsi. Complessivamente la percentuale dei decessi è stata del 26% [49]. In Taiwan dal 1996-2008 sono stati registrati 48 casi di listeriosi. Con una crescita dell'incidenza media annua da 0,029 a 0,118 casi su 1000 [77].

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 [114]. 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. A partire dal 2005, anno della nascita dell'*European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC), 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 [9, 8].

Nel documento “*The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015*” (EFSA 2016), redatto congiuntamente dall'*European Food Safety Authority* (EFSA) e dall' ECDC, sono stati raccolti ed esaminati i dati forniti dai da 32 Paesi europei (28 Stati membri e quattro Stati non membri: Norvegia, Islanda, Svizzera e Liechtenstein) riguardanti le malattie zoonotiche. Da questo report emerge che nell'UE c'è stata una tendenza all'aumento della listeriosi dal 2008 in poi, sottolineando però che il

numero di persone colpite si è stabilizzato tra il 2014 e il 2015 [177] (Fig.11). Nel 2015, 28 Stati Membri (MS) hanno riportato 2.206 casi confermati di listeriosi, segnalate per lo più in persone di età superiore ai 64 anni.

L'incidenza media della patologia nell'UE è di 0,46 casi per 100.000 abitanti nel 2015, molto simili al 2013 e al 2014, con il più alto tasso di notifica in Spagna, Malta, Svezia, Estonia e Finlandia (rispettivamente 0,99, 0,93, 0,90 , 0,84 e 0,84 casi/100.000 abitanti). Il più basso tasso di notifica è stato riportato in Bulgaria, Croazia e Romania (<0,1 casi/100.000 abitanti rispettivamente). In quest'anno il Portogallo ha notificato per la prima volta i casi di listeriosi, mentre Cipro e Lussemburgo non hanno riportato alcun caso.

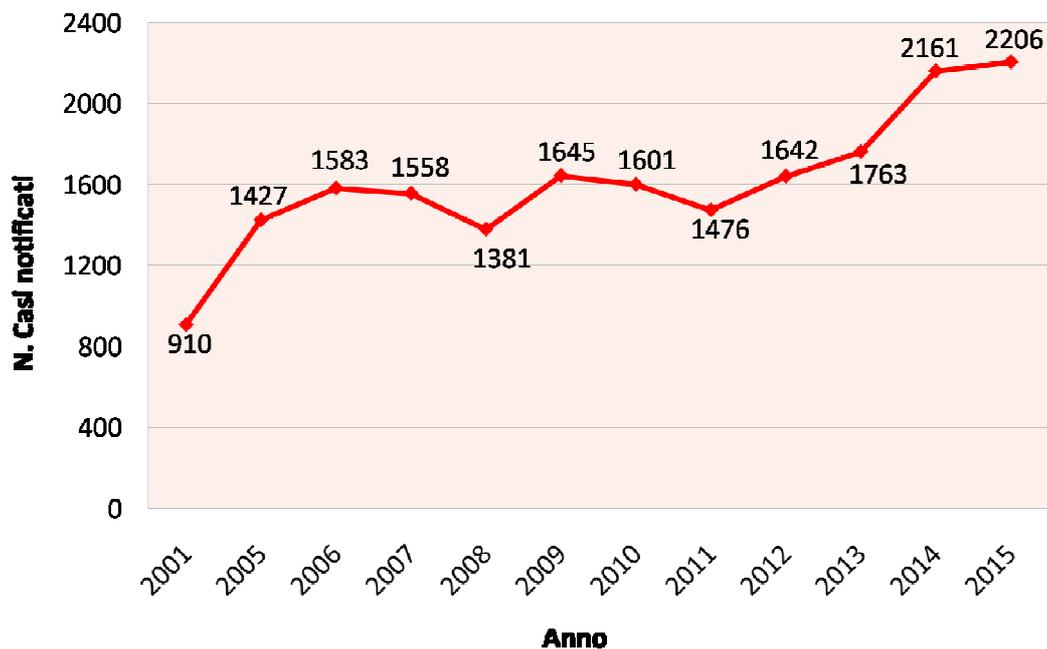


Figura 11: Casi notificati di listeriosi umana dal 2001 al 2015 in Europa

La listeriosi in Europa presenta un andamento stagionale, evidente in particolar modo negli anni 2008 e 2015, con un maggior numero di casi

riportati in estate e picchi più bassi in inverno. Nonostante si riporti un incremento statisticamente significativo ($p=0.018$) dei casi totali di listeriosi nel corso di questo periodo, il numero di casi si è stabilizzato nel 2015. Nessuno dei MS ha osservato alcuna tendenza alla diminuzione tra il 2008 e il 2015.

La listeriosi ha la più alta percentuale di casi ospedalizzati di tutte le zoonosi sotto la sorveglianza dell'UE con 1.524 casi confermati (69,1%) nel 2015. Diciotto MS, hanno fornito informazioni sul ricovero per tutti o la maggior parte dei loro casi, con un aumento del 38,0% di tutti i casi confermati dal 2014 al 44,9% del 2015. Tra i casi con il ricovero in ospedale noto, il 97,4% erano ospedalizzati.

Secondo il report EFSA-ECDC, 19 Stati membri hanno riportato un totale di 270 morti per listeriosi, il più alto numero di decessi annui registrati dal 2008 (media annua: 166), con un tasso di letalità del 17,7%. La Francia ha riportato il maggior numero di morti (75), seguita da Germania (45).

I soggetti maggiormente colpiti da questa patologia sono gli anziani di età superiore ai 64 anni con una percentuale che è aumentata dal 56% del 2008 al 64% del 2015. Inoltre, in questo periodo, il numero di casi segnalati e la loro percentuale sono quasi raddoppiati nei soggetti di età superiore a 84 anni (dal 7,3% al 12,8%). Il tasso di mortalità stimato per la fascia di età superiore ai 64 anni è stato del 20,3%, e del 26,7% per quella oltre gli 84 anni [161]. L'aumento delle infezioni da *Listeria* può essere parzialmente spiegato con l'invecchiamento della popolazione in Europa (Eurostat, 2016).

Secondo il report EFSA/ECDC, 27 Stati membri e 3 Paesi non appartenenti all'UE nel 2015 hanno riportato dati riguardanti la prevalenza di *L. monocytogenes* negli alimenti, osservati con l'analisi di un grande numero di campioni e categorie alimentari. Il report EFSA/ECDC del 2015 si

focalizza solo sui cibi *ready-to-eat* (RTE), in quanto alimenti ad alto rischio di contaminazione. I più alti livelli di non conformità riguardano i prodotti RTE ittici (principalmente pesce affumicato), i prodotti lattiero-caseari (diversi formaggi) e prodotti carnei per i campioni raccolti a livello del processamento, e prodotti della pesca e formaggi a pasta molle e semimolle per i campioni raccolti a livello della vendita al dettaglio.

Il sistema di allarme rapido per gli alimenti, gestito dalla Commissione e a cui partecipano gli Stati membri, la Commissione e l’Autorità europea per la sicurezza alimentare (RASFF), ha registrato, per il 2015, n. 738 notifiche per i pericoli derivanti da microrganismi patogeni (630 negli alimenti e 108 nei Mangimi). Delle 738 notifiche 99 riguardavano positività per *Listeria monocytogenes* (Tab.2).

Numero di notifiche per categoria di prodotti in cui si è riscontrata <i>L. monocytogenes</i>	Positività per <i>Listeria monocytogenes</i>
10 Crostacei	1 positività per <i>L. monocytogenes</i>
41 Pesci e prodotti della pesca	35 positività per <i>L.monocytogenes</i>
113 Frutta e vegetali	4 positività per <i>L. monocytogenes</i>
91 Carne e prodotti a base di carne	17 positività per <i>L. monocytogenes</i>
49 Latte e derivati	30 positività per <i>L. monocytogenes</i>
71 Noci e semi	1 positività per <i>L. monocytogenes</i>
5 Prodotti misti	2 positività per <i>L. monocytogenes</i>
162 Pollo e prodotti a base di pollo	6 positività per <i>L. monocytogenes</i>
4 Snack e prodotti pronti al consumo	2 positività per <i>L. monocytogenes</i>
3 Zuppe, salse e condimenti	1 positività per <i>L. monocytogenes</i>
Totale	99

Tabella 2. Notifiche RASFF 2015; positività per *L.monocytogenes* per categorie di prodotti.

Negli USA, un importante focolaio epidemico si è verificato nell'arco di diversi anni, tra il 2010-2015, con 10 casi di listeriosi segnalati in 4 Stati. Le indagini si sono avvalse di una rete di tipizzazione molecolare degli

isolati di *L. monocytogenes* (*PulseNet*) che viene utilizzata normalmente per le indagini epidemiologiche in corso di focolai tossinfettivi. Attualmente il sistema utilizza sia la tecnica dell'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) che il sequenziamento del genoma dei microrganismi (WGS) per la caratterizzazione degli isolati umani ed alimentari. Tutti i 10 casi sono stati ricoverati e 3 di essi hanno avuto un esito fatale. L'indagine retrospettiva da parte della sanità pubblica, CDC, e la FDA ha consentito di verificare l'identità genetica degli isolati umani con quelli provenienti dai campioni di gelato prodotto dalla Ditta *Blue Bell Creameries* in Oklahoma che ha volontariamente ritirato tutti i prodotti sul mercato.

Nel periodo Febbraio-Marzo 2014 in California e Maryland sono stati segnalati 8 casi di listeriosi (rispettivamente 1 e 7). Tutti i pazienti erano di etnia ispanica; 7 sono stati ricoverati in ospedale, di questi 5 erano donne in gravidanza. Il paziente della California è deceduto. L'indagine da parte del CDC e FDA ha indicato il ceppo epidemico di *L. monocytogenes* che ha causato le malattie è stato trovato in prodotti caseari prodotti da *Roos Foods* di Kenton, Delaware.

Nel 2016, negli Stati Uniti, sono stati registrati 3 *outbreak* multistato causati da *L. monocytogenes*. Uno di questi ha riguardato 9 casi di Listeriosi segnalati da quattro stati membri tra il 2013 e il 2016. Tre sono stati segnalati nel 2016 e i restanti 6 sono stati registrati tra il 2013-2015. Tutti i 9 casi erano ospedalizzati e 3 hanno avuto esito fatale. In almeno 1 dei decessi la listeriosi è stata la causa della morte. L'indagine da parte del CDC, e FDA ha indicato che le verdure surgelate prodotte da *CRF Frozen Foods of Pasco*, Washington e venduti con vari marchi sono state la probabile fonte di questa epidemia [176].

Il secondo *outbreak* multistato ha riportato 2 casi di listeriosi segnalati in California (1) e Florida (1) nel 2014. Entrambe le persone sono state

ricoverate, e una è deceduta in Florida a causa di listeriosi. Anche se i casi si sono verificati nel 2014, la fonte di queste malattie non era nota fino al 29 gennaio 2016, quando la FDA ha informato il CDC che la WGS sugli stipiti di listera isolata dal cioccolato al latte crudo prodotto da *Miller's Organic Farm* in Pennsylvania ha dimostrato una stretta associazione genetica con gli isolati umani e che dunque il *raw milk* era la fonte di infezione e causa della patologia [113].

Il terzo focolaio si è verificato tra luglio 2015 e gennaio 2016 riportando 19 casi di listeriosi segnalati da nove stati. I soggetti affetti avevano da 3 a 83 anni (età media era di 64 anni); il 74% era di sesso femminile e una di questi era una donna incinta. Tutti i 19 pazienti sono stati ricoverati, e uno di essi ha avuto esito letale. L'indagine da parte della sanità pubblica, CDC, e FDA ha indicato che le insalate confezionate prodotte a Springfield, Ohio *Dole Processing Facility* sono state la probabile fonte di questa epidemia [176].

Nel 2015, in Europa sono stati riportati 14 *outbreak* di listeriosi (11 a causa di *L. monocytogenes* e 3 a causa di una specie di *Listeria* non specificata) segnalati da nove Stati membri coinvolgendo 230 casi umani, 25 ospedalizzazioni di cui 4 con esito letale (Tab.3). Tre dei 5 più importanti *outbreak* sono stati correlati ad alimenti misti, mentre nei restanti 2 gli alimenti responsabili del contagio sono stati pasti a buffet e carne di maiale e derivati. Rispetto agli anni precedenti, è stato osservato un notevole aumento dei focolai epidemici a partire dal 2010 (n = 5), andamento che si è stabilizzato dal 2014 (N = 15). Nonostante il basso tasso di segnalazioni (<0.001 focolai per 100.000 abitanti), le epidemie che coinvolgono *Listeria* hanno avuto un elevato peso in sanità pubblica, a causa della gravità del quadro clinico e dell'elevato tasso di letalità associato alla patologia. Due

decessi si sono verificati in un piccolo focolaio epidemico (sierotipo 1/2a) che ha coinvolto 2 casi ospedalizzati segnalati dalla Grecia.

Il più grande *outbreak* è stato riportato dalla Germania con 159 casi segnalati di cui solo 2 erano ospedalizzati. Questo focolaio di forte evidenza si è verificato in una scuola o asilo ed è stato associato al consumo di alimenti misti (budino di riso).

Le informazioni relative al sierotipo, nell'UE, sono disponibile solo per sei *outbreak*: 4 sono associati al sierotipo 4b e 2 associati al sierotipo 1/2a [161].

Country	Number of s-e	Cases (s-e)	Hospitalized (s-e)	Deaths (s-e)	Number of w-e	Cases (w-e)	Hospitalized (w-e)	Deaths (w-e)	Total	Reporting rate per 100,000
Denmark	0	0	0	0	1	2	2	0	1	0,02
Finland	1	24	1	0	0	0	0	0	1	0,02
Germany	1	159	2	0	3	6	0	0	4	<0.01
Greece	0	0	0	0	1	2	2	2	1	0,01
Italy	1	12	12	2	0	0	0	0	1	0,00
Latvia	0	0	0	0	2	4	2	0	2	0,10
Netherlands	0	0	0	0	1	3	0	0	1	0,01
Portugal	1	3	3	0	0	0	0	0	1	0,01
Sweden	1	13	1	0	1	2	0	0	2	0,02
Total (MSs)	5	211	19	2	9	19	6	2	14	<0.01

Note: 's-e'= strong-evidence outbreaks; 'w-e'= weak-evidence outbreaks

Tabella 3: Forti e deboli outbreak causati da *L. monocytogene* in Europa nel 2015

Un importante focolaio epidemico di listeriosi si è verificato in Italia tra maggio 2015 e gennaio 2016 nella regione delle Marche, riportando 13 casi e 2 decessi. I pazienti avevano un'età media di 72 anni; 7 su 13 erano maschi, e al momento dell'infezione 12 casi su 13 erano affetti da patologie debilitanti o condizioni di rischio (immunosoppressione farmacologica, stato di gravidanza, etc.). I ceppi di *L. monocytogenes* isolati da questi pazienti appartenevano al sierotipo 1/2a che, in base alla tipizzazione

molecolare attraverso elettroforesi in campo pulsato (PFGE), sono risultati appartenenti allo “stesso pulstipo”. Le indagini epidemiologiche e microbiologiche effettuate hanno rilevato come verosimile veicolo dell’infezione un prodotto a base di carne denominato “coppa di testa” proveniente da uno stabilimento di piccole dimensioni operante nella provincia di Ancona. E’ stato attivato il Sistema Rapido di Allerta comunitario (RASFF) per il ritiro dei prodotti commercializzati (notifica del 4 febbraio 2016). Inoltre, la ditta produttrice della “coppa di testa” ha attivato le procedure di richiamo di tutti i lotti del salume potenzialmente contaminati. La Regione Marche ha diramato un comunicato stampa per avvisare i consumatori sul rischio di Listeriosi e per la possibile assunzione di alimento contaminato (“coppa di testa”), e ha diffuso il materiale informativo destinato ad operatori sanitari e alle categorie di persone più a rischio al fine di ridurre le probabilità di infezione da *Listeria* e facilitare l’identificazione di eventuali ulteriori casi.

Per le opportune indagini finalizzate all’individuazione della fonte di contaminazione primaria da *L. monocytogenes*, l’Autorità competente locale, attraverso i Servizi Veterinari dell’ASUR, ha attivato le procedure di controllo ufficiale lungo tutta la filiera di produzione dei salumi. Le Autorità competenti hanno effettuato una valutazione del rischio utilizzando gli strumenti di “rapid risk assessment” messi a disposizione dal centro europeo di controllo delle malattie (ECDC) [137; 178].

In Italia dal 2003 al 2015 sono stati notificati al Sistema di Sorveglianza delle Malattie Infettive 1.231 casi di listeriosi. L’andamento del numero dei casi mostra un incremento progressivo dal 2003 al 2010, successivamente si osserva una stabilità del numero di casi notificati al sistema. Parallelamente, il tasso d’incidenza è aumentato progressivamente da 0,84 per milione di abitanti nel 2003 a 2,64 per milione nel 2010. Il 54.7 % dei

casi segnalati in tutto il periodo considerato è di sesso maschile e più del 50% dei casi ha un'età pari o superiore a 65 anni. La classe d'età 0-14 con il 21,04% dei casi raccoglie prevalentemente la listeriosi neonatale e perinatale. In totale, in Italia, sono stati osservati 1.765 ricoveri per listeriosi. L'incremento delle notifiche e delle ospedalizzazioni per *Listeria* è probabilmente legato sia al miglioramento delle capacità diagnostiche che all'aumentata sensibilità del sistema di sorveglianza che ha permesso una maggiore notifica dei casi [181].

Relativamente alla tipizzazione sierologica, si conferma il trend notato negli anni e caratterizzato da un'inversione di tendenza in Italia, come anche in alcuni paesi europei, della prevalenza del sierotipo 1/2a rispetto al sierotipo 4b. Nei pazienti con condizioni predisponenti, come anziani e individui immunodepressi, la sintomatologia setticemica sembrerebbe più frequente rispetto a quella meningoencefalitica, dove risulta più presente il sierotipo 4b, considerato più virulento [133].

1.4.1 Alimenti a rischio e quadro normativo

Data la natura ubiquitaria, *L. monocytogenes* contamina sia alimenti di origine animale che vegetale qualora presentino caratteristiche tali da promuoverne la moltiplicazione, tra cui prolungata *shelf-life* o assenza di ulteriori trattamenti prima del consumo. *L.monocytogenes* resiste a diversi stress ambientali, tra cui basse temperature, elevate concentrazioni di cloruro di sodio, elevati tenori in grassi, bassi valori di attività dell'acqua, acidità e alcalinità; cresce sia in condizioni di microaerofilia che anaerobiosi e la presenza di nitrati di sodio non ne inibisce la replicazione. Quindi, il rischio di contaminazione degli alimenti è elevato. Inoltre il patogeno può colonizzare, sotto forma di biofilm, attrezzature di

trasformazione alimentare e le superfici di contatto con gli alimenti e può quindi persistere per periodi di tempo prolungati in ambienti di lavorazione degli alimenti. Quindi, una vasta gamma di prodotti alimentari può essere contaminata durante la fase di raccolta, ma soprattutto durante la fase di trasformazione alimentare. Gli alimenti maggiormente coinvolti in casi epidemici di listeriosi sono i *ready-to-eat* (RTE), prodotti vegetali e/o animali pronti al consumo, che generalmente sono confezionati e conservati a temperatura di refrigerazione [84; 5; 63]. La conservazione refrigerata si è progressivamente diffusa e ha caratterizzato l'evoluzione del segmento distributivo, con una progressiva crescente domanda di prodotti *ready-to-eat*. Con la globalizzazione del mercato alimentare si sono registrati i primi casi epidemici a livello internazionale. Il limite microbiologico UE per *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari RTE sul mercato è fissato a 100 CFU/g. Anche se salumi e formaggi a pasta morbida sono stati inizialmente considerati fra le principali categorie di alimenti ad alto rischio per la listeriosi negli esseri umani, i risultati ottenuti su vari alimenti testati e da indagini sui focolai in tutto il mondo negli ultimi dieci anni hanno ampliato l'elenco dei cibi implicati: RTE a base di carne, latte, pesce e prodotti della pesca, ma anche altri prodotti come frutta, insalate e altri RTE [55]. L'evento più eclatante di Listeriosi dovuta a RTE in Italia, che ha coinvolto 1500 persone (292 ospedalizzazioni) si è avuto nel 1997 per il consumo di insalata di tonno e mais contaminata [11]. Oltre agli RTE altri alimenti ad alto rischio di contaminazione sono i prodotti lattiero-caseari, in quanto il latte crudo può essere inquinato da diverse fonti ambientali (suolo, feci, ecc.) o prodotto da vacche mastitiche. Inoltre, la refrigerazione non blocca lo sviluppo del microrganismo. La corretta pastorizzazione elimina il patogeno, ma in alcuni prodotti può essere non efficace o non applicabile, in quanto altererebbe l'aroma

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

(prodotti tipici). Particolarmente coinvolti sono i formaggi a pasta molle o semi-dura, in cui l'Aw è superiore rispetto a quelli a pasta dura, gli erborinati (gorgonzola e taleggio) o a maturazione superficiale (camembert) per lo sviluppo di microflora disacidificanti in superficie [138]. Anche i prodotti carnei, soprattutto fermentati, sono coinvolti in casi di listeriosi. La fonte di contaminazione è la cute delle carcasse da cui il patogeno diffonde ad attrezzature e locali contaminando le carni; il consumo di carni poco cotte o contaminate dopo la cottura rappresenta un serio rischio, in quanto il microrganismo può moltiplicarsi fino a livelli pericolosi. Si stima che il 15-70% degli hot-dogs sia contaminato, compresi insaccati freschi e stagionati. Per quanto riguarda i prodotti vegetali, quelli che per morfologia hanno un maggior contatto con il suolo sono stati implicati in importanti epidemie di listeriosi. Quindi, in generale, per i vegetali freschi la contaminazione può verificarsi in preraccolta per il contatto con il suolo, mentre la causa più frequente di contaminazione in alimenti crudi di origine animale è la scarsa igiene nelle fasi di mungitura e macellazione. Tuttavia, la contaminazione può avvenire in ogni fase produttiva, nella vendita al dettaglio e in ambito domestico [106].

L'eliminazione del biofilm è cruciale per la sicurezza alimentare, in quanto protegge il patogeno da sollecitazioni meccaniche e chimiche e permette la sopravvivenza in zone difficilmente raggiungibili dal sanificante. La sua eradicazione è molto difficile e l'unico mezzo di prevenzione è il rispetto della buona prassi lavorativa e igienica nelle fasi di produzione [90]. L'informazione e la formazione dei consumatori sui rischi associati a *L. monocytogenes* e il rispetto delle buone pratiche di produzione e igiene lungo tutta la filiera alimentare sono fattori determinanti per ridurre l'incidenza della listeriosi.

La Normativa europea ha affrontato questa problematica, sottolineando come “i prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana” [139], fissando i criteri microbiologici che devono essere rispettati per le diverse categorie di alimenti [18]. Per *L.monocitogenes* i criteri di sicurezza alimentare impongono un limite non superiore alle 100 UFC/g per gli alimenti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali per i quali vige l’assenza di *L. monocytogenes* in 25g. Anche i prodotti con pH = 4,4 o acqua libera = 0,92, i prodotti con pH =5,0 e acqua libera =0,94, i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni sono considerati appartenenti a questa categoria. Si ammette, infatti, che in tale breve lasso di tempo e a temperatura di refrigerazione non riesca a superare 100 UFC/g. I destinatari del presente Regolamento sono gli operatori del settore alimentare (OSA) ad esso infatti è affidato il controllo e il rispetto dei criteri microbiologici, durante le diverse fasi della filiera quali lavorazione, fabbricazione, manipolazione, compresa la fase di vendita al dettaglio e della distribuzione. Negli USA, il Dipartimento per l’Agricoltura (USDA) applica la ‘tolleranza zero’ a tutti i cibi pronti al consumo fin dagli anni ’80 [127].

Dal punto di vista istituzionale, in considerazione del carattere zoonosico della malattia, trasmissibile per via alimentare, in Italia la listeriosi è stata inclusa dal legislatore comunitario nella Direttiva 2003/99/CE, Allegato I, (recepita nell’ordinamento nazionale con il Decreto legislativo del 4/04/06 n° 191/2006) tra le zoonosi e gli agenti zoonotici per i quali sono state stabilite reti di sorveglianza e l’obbligo di denuncia [140]. Nella nuova rete di sorveglianza *The European Surveillance System* (TESSy) coordinata

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

dall'ECDC Anche il Reg. 2073/2005 all'articolo 7, nei punti 2, 3 e 4, indica le azioni che l'OSA dovrà adottare nel caso di non conformità: il prodotto o la partita di prodotti sono “ritirati” o “richiamati” in conformità a quanto stabilito dall'art. 19 del regolamento 178/2002. Le reti di sorveglianza, volte a individuare focolai di infezione e determinarne la causa, permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato che adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione e informando la popolazione a rischio [10]. Dal 2010 la listeriosi fa parte del sistema *Enter-Net* Italia, incorporato nella nuova rete di sorveglianza TESSy coordinata dall'ECDC. Il sistema *Enter-Net* Italia si avvale della collaborazione di una rete di 20 laboratori di riferimento regionali a cui affluiscono i dati dei laboratori periferici [179].

Il sistema di sorveglianza prevede che i laboratori periferici inviino all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), appena possibile e comunque entro un mese dall'isolamento, i ceppi di *L. monocytogenes* isolati da campioni clinici, accompagnati da scheda di notifica. L'ISS eseguirà sugli isolati la conferma biochimica e la tipizzazione sierologica e molecolare.

L'ISS invia con cadenza annuale i dati epidemiologici e microbiologici (sierotipo e pulsotipo) degli stipiti isolati al Ministero della Salute, che li invia all'ECDC e provvede alla diffusione dei dati di sorveglianza sul territorio nazionale [180].

2. SCOPO DEL LAVORO

Listeria monocytogenes, agente infettivo della listeriosi, è un microrganismo che sebbene causi patologie caratterizzate da una modesta incidenza, ha un notevole impatto in Sanità Pubblica per l'elevata mortalità (20-30%) e l'alto tasso di ospedalizzazione (90%) che la caratterizzano.

Le manifestazioni cliniche vanno da gastroenteriti autolimitanti in soggetti in buono stato di salute e senza fattori predisponenti, a meningiti, meningoencefaliti, sepsi, setticemie in gruppi a più elevato rischio come neonati, anziani e immunocompromessi, oltre a determinare aborti spontanei in donne in gravidanza o, in taluni casi essere causa di decessi. Le infezioni sub-cliniche come quelle gastroenteriche spesso non vengono segnalate e la listeriosi umana viene diagnosticata quasi esclusivamente nelle manifestazioni della forma invasiva, rendendo estremamente difficile la stima del reale impatto dell'infezione nella popolazione.

È una patologia trasmessa attraverso il consumo di alimenti, anche se molto spesso il nesso causale tra caso clinico e alimento è di difficile dimostrazione, per l'ampia oscillazione del periodo di incubazione (da 1 a 90 giorni), che non permette di risalire alla definizione del corretto modello epidemiologico dell'infezione. Per tali motivazioni, e visto che le manifestazioni cliniche sono spesso "sfumate" nella loro sintomatologia, è possibile che diversi casi sostenuti dal microrganismo non siano riconosciuti e, spesso, non esattamente diagnosticati. Tutto ciò si traduce in una possibile sottotifica.

I prodotti alimentari maggiormente coinvolti, come sopra descritto, sono gli RTE, alimenti pronti al consumo che mostrano un rischio elevato in quanto rappresentano un substrato ideale per la crescita del microrganismo, con prolungata *shelf-life* a temperature di refrigerazione, confezionati senza un

trattamento per eliminare il microrganismo e consumati spesso senza cottura.

In Italia, come in Europa e Stati Uniti, la sorveglianza epidemiologica della listeriosi risulta essere ancora limitata, con prevalente interesse rivolto ai focolai.

Esiste, quindi, un ampio consenso sulla necessità di attivare programmi di sorveglianza della listeriosi invasiva e gastrointestinale attraverso una migliore comunicazione e *reporting* per l'analisi di casi clinici, alimenti e fonti ambientali.

Sulla base di tali premesse, la Sezione di Igiene e Medicina Preventiva del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari, struttura appartenente, per le competenze assistenziali, all'U.O.C. di Igiene dell'Azienda Ospedaliero Universitaria, che già dal 2000 è stata individuata dalla Regione Sardegna come Laboratorio Regionale di riferimento nella rete di sorveglianza nazionale applicata alle meningiti batteriche, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità, ha già da tempo avviato un articolato progetto di Ricerca, in collaborazione con la Sez. di Ispezione degli alimenti del Dipartimento di Veterinaria.

Il principale obiettivo del progetto di ricerca assegnatomi è stato quello di sorvegliare le infezioni sostenute da *L. monocytogenes* attraverso l'implementazione di un sistema di sorveglianza attiva ospedaliera e comunitaria allo scopo di descrivere le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione nel territorio del Nord Sardegna e descrivere, da un punto di vista fenotipico e genotipico, i ceppi isolati dall'uomo, dagli alimenti e dall'ambiente.

In particolare gli obiettivi identificati sono stati:

- ottimizzare le procedure diagnostiche in atto in pazienti con manifestazioni cliniche riferibili a meningite e meningo-encefalite;

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

- implementare la sorveglianza mediante la ricerca di *L. monocytogenes* in pazienti immunodepressi con sintomatologia gastro-intestinale ricoverati nei reparti di Malattie Infettive, Oncematologia dell’AOU di Sassari e in soggetti ospiti di una comunità di recupero del territorio del Nord Sardegna, molti dei quali sieropositivi per HIV.

sul versante ambientale:

- valutare il livello di contaminazione degli ambienti di produzione di alimenti prodotti e distribuiti presso *strutture ospedaliere* del territorio del Nord Sardegna, presso tre caseifici, uno dei quali ubicato presso una comunità di recupero di tossicodipendenti;

sul versante alimentare:

- attraverso il monitoraggio microbiologico dei a) pasti distribuiti da Ditte convenzionate nei reparti di ricovero, b) di prodotti RTE erogati da distributori automatici collocati presso le strutture ospedaliere, c) di alimenti RTE (formaggi, insalate di riso, prodotti di IV gamma, prodotti a base di carne cotti e prodotti ittici) disponibili in commercio presso punti vendita al dettaglio e d) prodotti lattiero-caseari, freschi, prodotti nei suddetti caseifici e una comunità di recupero di tossicodipendenti.

I ceppi di *L. monocytogenes* isolati dall’uomo, dagli alimenti e dagli ambienti di lavorazione, sono stati caratterizzati genotipicamente (PCR, PFGE, MLST) al fine di definire le possibili relazioni di clonalità tra i ceppi di origine umana, alimentare e ambientale e, successivamente, congelati al fine di disporre di una ceppoteca.

Inoltre, si è voluto valutare il pattern immunologico dei soggetti con malattia invasiva, al fine di verificare se fossero caratterizzati da una alterata responsività all’infezione, riconducibile ai principali elementi della

immunità sopra descritti; questo al fine di spiegare la loro incapacità di rispondere positivamente all'infezione e approfondire le conoscenze circa la predisposizione di alcuni soggetti ad sviluppare malattia invasiva da *L. monocytogenes*.

3. MATERIALI E METODI

Il progetto di ricerca è stato articolato in diverse fasi. In una prima fase è stata predisposta la documentazione necessaria per la richiesta di autorizzazione dello studio da parte del Comitato Etico del Complesso Azienda Sanitaria Locale n. 1 e Università di Sassari. Contestualmente, è stata progettata e predisposta una scheda per la raccolta dei dati clinici ed epidemiologici dei soggetti reclutati. La scheda è stata suddivisa in otto sezioni: quella relativa alla raccolta dei dati anamnestici, della sintomatologia pregressa, di quella in atto, diagnosi effettuata dal reparto di ricovero, profilo immunitario del soggetto, abitudini alimentari e informazioni relative al recente consumo di alimenti a rischio.

Sebbene *L. monocytogenes* sia ricercata prevalentemente negli alimenti e in campioni di liquor/sangue di soggetti con malattia invasiva, in letteratura esistono poche informazioni riguardanti l'isolamento di tale microrganismo dalle feci di soggetti portatori o con sintomatologia gastrointestinale. Pertanto, si è proceduto allo sviluppo di un protocollo diagnostico colturale che permettesse l'isolamento di *L.monocytogenes* in campioni di feci di soggetti immunodepressi, ricoverati nei reparti di Onco-Ematologia e Malattie Infettive dell'A.O.U. di Sassari e di ospiti di una comunità per il recupero di tossicodipendenti, con o senza sintomatologia gastrointestinale. Allo scopo è stato utilizzato, riadattato, un protocollo diagnostico per la ricerca di *L. monocytogenes* negli alimenti, facendo riferimento al sistema ISO 11290-1, ma modificato per campioni di origine umana. L'obiettivo era di trovare un sistema colturale che permettesse di migliorare la capacità di isolamento del microrganismo seppur presente in un campione polimicrobico quale il materiale fecale. Per testare la metodica sono state allestite delle prove con inoculi di *L. monocytogenes* in campioni di feci e

tamponi rettali nei quali era stata esclusa la presenza del patogeno. Per la preparazione dell' inoculo è stata utilizzato un ceppo di riferimento ATCC di *L. monocytogenes* cresciuto su terreno agarizzato *Trypticase Soy Agar* (TSA), stemperato in 0,1 ml di soluzione fisiologica e successivamente trasferito in una provetta falcon contenete 1g di feci precedentemente pesato. Le fasi successive sono state condotte seguendo il protocollo ISO che prevede un primo arricchimento in *Fraser Broth Half Concentration* (HFB), un secondo arricchimento in *Fraser Broth* (FB) e l'isolamento su terreno *Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti* (ALOA), un terreno cromogenico selettivo e differenziale per la ricerca di *L.monocytogenes* che permette di differenziare le colonie di *L.monocytogenes* (colonie verde-blu circondate da un alone opaco) da quelle di *Listeria* spp (*colonie verde-blu senza alone*).

Il brodo di arricchimento *Fraser Half* contiene acido nalidissico e acriflavina a concentrazioni dimezzate rispetto al *Fraser Broth*. Entrambi i terreni contengono ferro ammonio citrato. La presenza di *Listeria* nei due brodi é indicata dall'annerimento della coltura, dovuta alla reazione della esculetina, prodotta dall'idrolisi dell'esculina con gli ioni ferro.

Protocollo ISO 11290-1 modificato per feci

1° giorno:

- Stemperare il tampone rettale o un ansata di feci in 10 ml di Fraser Broth Half Concentration (HFB).
- Vortexare e incubare a 30°C per 24 ± 3 ore.

2° giorno:

- Dispensare e seminare 2 gocce della brodocoltura su terreno ALOA.
- Incubare la piastra di ALOA a 37°C per 24 ± 3 ore e se vi fosse crescita scarsa o nessuna crescita, re-incubare per altre 24 ± 3 ore.
- Trasferire 0,1 ml della brodocoltura in 10 ml di Fraser Broth (FB).

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

- Vortexare e incubare a 37° per 48 ± 3 ore.h.

3° giorno:

- Lettura della piastra ALOA

4° giorno:

- Dispensare e seminare 2 gocce della brodocoltura FB su terreno ALOA.
- Incubare la piastra di ALOA a 37°C per 24 ± 3 ore e se vi fosse crescita scarsa o nessuna crescita, re-incubare per altre 24 ± 3 ore.

5° giorno:

- Lettura delle piastre ALOA. Osservare la crescita di colonie tipiche.

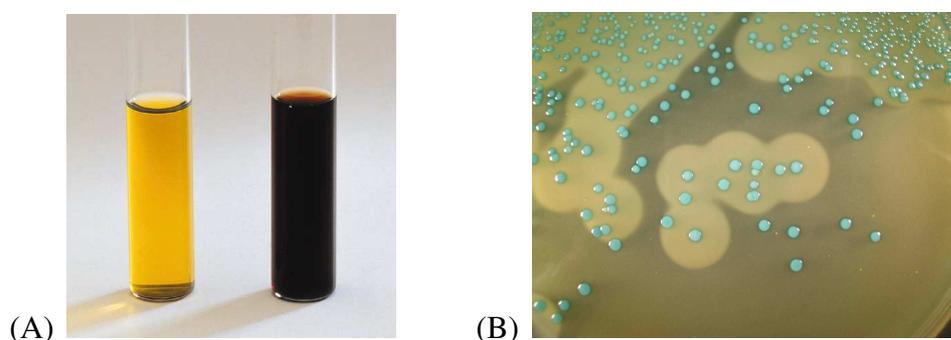


Figura 12: (A) Crescita di *L. monocytogenes* su terreno *Fraser Broth*; (B) crescita di *L. monocytogenes* su terreno ALOA con tipiche colonie verdi circondate da un'alone

Le colonie sospette sono state confermate attraverso la colorazione di Gram, il test della catalasi e quello di identificazione biochimica (API Listeria).

Contestualmente, dal primo brodo di arricchimento HFB si è proceduto all'estrazione del DNA mediante il QIAamp DNA Mini kitQiagen e all'identificazione del microrganismo attraverso metodiche di biologia molecolare in PCR real-time descritte successivamente.

Nei casi di sospetta encefalite o meningo-encefalite di n.d.d., diagnosticata generalmente da pazienti ricoverati nel reparto di Malattie Infettive dell'AOU di Sassari, ma anche da altre strutture assistenziali del territorio

del Centro-Nord Sardegna, i campioni di sangue intero, siero, liquor vengono solitamente inviati alla U.O.C. di Igiene dell'AOU di Sassari, per la diagnosi eziologica attraverso l'utilizzo di metodiche colturali tradizionali e di biologia molecolare.

La metodica colturale ha previsto la semina di una goccia di liquor su terreno Columbia Agar e Agar Cioccolato e il trasferimento di 1 ml di liquor su una vial pediatrica e processata con il sistema automatizzato Vitek 2, che si basa sulla semina della sospensione batterica (cresciuta overnight fino a raggiungere la concentrazione corrispondente a 0,5 della scala di McFarland) in specifiche card, costituite da pozzetti appaiati contenenti terreni di identificazione biochimica in forma disidratata. Nello stesso strumento, per il medesimo microrganismo in esame, è stata posizionata una card specifica per il saggio *in vitro* agli antibiotici. Questa è costituita da pozzetti appaiati contenenti antibiotici disidratati a concentrazioni note. Contestualmente, tutti i campioni sono stati analizzati con metodica molecolare in PCR real-time, che grazie all'utilizzo di una copia di *primer* e di una sonda marcata con sostanza fluorescente (*probe*), permette di evidenziare in tempi rapidissimi la presenza del DNA del microrganismo e di valutare la quantità di DNA presente. Il protocollo operativo ha previsto, dapprima, l'estrazione del campione mediante il QIAamp DNA Mini kit Qiagen.

Protocollo di estrazione del DNA.

- Aggiungere a 200 µl di campione, 200 µl di LysisBuffer e 20 µl di Proteinasi K.
- Vortexare brevemente e incubare a 56°C per 10 minuti.
- Centrifugare velocemente.
- Aggiungere 200 µl di ethanol (96-100%) e vortexare 10''.
- Trasferire il tutto in una colonnina Qiagen col filtro.

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluato e tenere il filtro da trasferire in un'altra colonnina.
- Aggiungere 500 µl di Washing Buffer 1.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluato e trasferire il filtro in un'altra colonnina.
- Aggiungere 500 µl di Washing Buffer2.
- Centrifugare a 14000 rpm per 3'.
- Eliminare l'eluato e trasferire il filtro in una nuova provetta.
- Aggiungere 200µl di Elution Buffer.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare il filtro e tenere l'eluato nella provetta.
- L'eluato può essere stoccato a -20°C.

Successivamente all'estrazione del DNA batterico, l'analisi dei campioni è stata effettuata utilizzando coppie di primers e probe, marcato con il fluoro foro JOE, che individua il gene *hlyA* che codifica per la Listeriolisina O (LLO), uno dei principali fattori di virulenza della *L.monocytogenes*, gene particolarmente conservato da eventuali mutazioni.

HLY-F 5'-AGCTGGGATTGCGGTAACAG-3'

HLY-R 5'-AAAGAGTATCACCAGCTTCGACTAC-3'

HLYQ-Probe 5'-JOE-TTGCTGCGCCAACAATCGCATC-TAMRA-3'

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume pari a 25µl contenente 2x Taqman Universal Master Mix e 5µl di DNA estratto. Sono stati inclusi, in ogni corsa, un controllo negativo (H₂O) e un controllo positivo (DNA di *L.monocytogenes* isolato da campioni di sangue o CSF isolati da pazienti e conservati nella ceppoteca del Laboratorio di biologia molecolare della Sezione di Igiene e Medicina Preventiva).

Protocollo di amplificazione del DNA

- Preparare una mix per N campioni in una provetta da 1,5 ml
 - 12,5 µl di 2x Taqman UniversalMaster Mix
 - 3 µl di PrimerForward+Reverse
 - 2 µl di Probe
 - 2,5 µl di H₂O

Aliquotare 20 µl della mix in provette da 0,2 ml

- Pipettare 5µl di DNA nella miscela PCR
- Aggiungere 5µl di Controllo PCR alla provetta di controllo positiva.
- Aggiungere 5µl di acqua distillata alla provetta di controllo negativa.
- Posizionare i campioni nel blocco termico preriscaldato e calibrato.

Il DNA è stato amplificato con l'ABI 7500 (AppliedBiosystem), utilizzando i seguenti parametri di amplificazione:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturation	95 °	10 min.	
Annealing	95 °	15 min.	45 cicli
Extension	60 °	1 min.	

Sono stati considerati negativi i campioni con emissione di fluorescenza successiva al 45 ciclo di amplificazione.

Contestualmente, al fine di valutare la prevalenza dell'infezione è stato condotto uno studio epidemiologico trasversale coinvolgendo, da un lato, pazienti immunodepressi ricoverati nei reparti di Malattie Infettive, Oncematologia dell'AOU di Sassari con sintomatologia gastrointestinale, probabilmente ascrivibile a *L.monocytogenes* e, dall'altro, soggetti ospiti di una comunità di recupero del territorio del Nord Sardegna, molti dei quali sieropositivi per HIV.

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

Sul versante ambientale/alimentare, si è proceduto alla ricerca di *L. monocytogenes* in alimenti ad elevato rischio di contaminazione ed in stabilimenti di produzione degli alimenti stessi. Per questi studi ci si è avvalsi della collaborazione della Sezione di Ispezione degli alimenti del Dipartimento di Veterinaria. Poiché i prodotti lattiero caseari fanno parte di quegli alimenti a più elevato rischio di contaminazione, si è proceduto ad un campionamento ambientale in due caseifici del Nord Sardegna, dove sono state raccolte ed analizzate ricotte salate e formaggi duri a lunga maturazione a base di latte ovino. I siti di campionamento sono stati scelti in accordo con le linee guida dell'*International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF). In diverse aree (ricevimento latte, caseificazione formaggi duri e formaggi freschi, stufatura, celle, lavaggio formaggi, stagionatura e confezionamento) sono state campionate le *superfici a diretto contatto* con l'alimento, a più elevato rischio di contaminazione, quali: filtro latte, stampi, nastro trasportatore, carrelli, scaffali, tavoli e macchina lava formaggi e le *superfici non a contatto* con l'alimento, a basso rischio di contaminazione, quali pavimenti e canalette di scolo. Oltre a questi sono state campionate le superfici non a contatto ma adiacenti all'alimento (medio rischio), rappresentati da carrelli drenaggio, tavoli, scaffali e ripiani.

Un altro campionamento ambientale è stato effettuato presso la comunità di recupero di tossicodipendenti dove si è proceduto alla valutazione del livello igienico sanitario dei locali del caseificio aziendale e dei locali di preparazione pasti. Sono state campionate le superfici a contatto e non a contatto con l'alimento e contestualmente sono stati prelevati alcuni campioni di alimenti stoccati nel frigorifero e pronti alla somministrazione. In tale struttura sono stati campionati il pavimento e assi in legno della cella frigo, canalette, pavimento e ripiano di sgrondo della sala lavorazione

del caseificio. Nella cucina interna alla comunità, dove vengono preparati tutti i pasti per il personale e gli ospiti, sono stati campionati il pavimento, la canaletta, due ripiani di lavoro in acciaio e uno in marmo, le pareti e il fondo del frigorifero. Per quanto riguarda i campioni alimentari sono stati prelevati campioni di focacce farcite, tramezzini farciti e insalata di riso. Per lo studio del profilo microbiologico degli alimenti selezionati sono stati valutati la Carica Mesofila Totale a 30°C (ISO 4833-1:2013), l'eventuale presenza di *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2: 2004), *Listeria* spp. (ISO 11290-1/2:1996/amd 2004) e *Pseudomonas* spp. (ISO/TS11059:2009).

Nell'ambito dell'attività di sorveglianza degli alimenti a più elevato rischio di contaminazione, si è voluto valutare il possibile livello di esposizione all'infezione di soggetti ospedalizzati, attraverso il campionamento di alimenti disponibili presso strutture ospedaliere. A tale scopo si è proceduto alla ricerca di *L. monocytogenes* in *Ready To Eat Sandwiches* (RTES) disponibili presso distributori automatici collocati all'ingresso di reparti a elevato rischio come ostetricia e ginecologia, ematologia, malattie infettive ecc. Si è proceduto all'acquisto random di 55 RTES, tutti confezionati in atmosfera modificata (MAP), prodotti da 5 differenti ditte dell'intero territorio nazionale, commercializzati presso distributori automatici refrigerati collocati in 6 differenti strutture ospedaliere della Regione Sardegna. Sono stati campionati prodotti da forno (pan carrè, panini e focacce) con diverse farciture (pomodori, insalata, salame Milano, mortadella, funghi, olive, formaggi, tonno e maionese). Per lo studio del profilo microbiologico degli alimenti selezionati sono stati valutati *Stafilococchi* coagulasi positivi, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., mesofili aerobi. Si è inoltre proceduto alla misurazione dell'acqua libera (aW) e del pH sull'intero campione e alla valutazione del gas dello spazio di testa.

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

Contestualmente, si è proceduto al campionamento di altre tipologie di alimenti RTE disponibili in commercio presso punti vendita al dettaglio. Sono stati eseguiti 3 campionamenti in cui sono stati prelevati 30 RTE confezionati e pronti al consumo, scelti tra quelli con maggior rischio di contaminazione da *L. monocytogenes* quali: formaggi, insalate di riso, prodotti di IV gamma, prodotti a base di carne cotti e prodotti ittici.

Successivamente, sempre al fine di valutare il livello di esposizione dei soggetti appartenenti alle categorie ad alto rischio, è stato condotto un campionamento presso un laboratorio di preparazione e somministrazione pasti che fornisce alimenti cotti e pronti al consumo per diverse strutture ospedaliere. Sono state interessate diverse aree di lavorazione dello stabilimento quali: area salumi e formaggi, area carni, area frutta e verdura, cucina. Per quanto riguarda gli alimenti, si è proceduto al campionamento dei soli alimenti RTE: insalata confezionata, formaggio semi stagionato e salame affettato.

Il campionamento delle superfici a contatto e non a contatto con l'alimento è stato effettuato mediante l'utilizzo del kit commerciale (3M, St. Paul, Minnesota, USA) contenente sponge sterili pre-inumidite con un tampone neutralizzante per le superfici pulite (neutralizza i residui di disinfettante), sponge sterili pre-inumidite con dell'acqua peptonata neutra (substrato utile per il mantenimento dei microrganismi durante il trasporto) per quelle in uso, delimitatori di superficie (totale superficie campionata per sponge = 100 cm²), guanti sterili e sacchetto sterile per il trasporto della sponge a temperatura di 4 ± 2 °C.

Su tutti i campioni prelevati (matrice alimentare o superficie ambientale) la ricerca di *L. monocytogenes* è stata eseguita utilizzando le metodiche internazionali descritte nella norma ISO 11290-01:2005 (ricerca

qualitativa) e ISO 11290-02:2005 (ricerca quantitativa). La ricerca quantitativa è stata fatta solamente per gli alimenti.

Protocollo ISO 11290-01 (ricerca qualitativa)

1° giorno:

prearricchimento

- Aggiungere a ciascuna sponge 90 ml di terreno liquido di pre-arricchimento Fraser Broth Half Concentration (HFB).
- Pesare 25 gr di alimento e aggiungere 225 ml di HFB.
- Incubare sia la sponge che l'alimento a 30 °C ±2 °C per 24 ore.

2° giorno:

Sottocoltura dal prearricchimento su agar selettivi

- Dispensare e spatolare 100 µl della brodocoltura su una piastra ALOA.
- Dispensare e spatolare 100 µl della brodocoltura su una piastra di Listeria Selective Agar base (Oxford).
- Incubare le piastre di ALOA e OXFORD a 37°C per 24 ore.

Arricchimento

- Trasferire 0,1 ml del brodo di prearricchimento HFB in una provetta contenente 10 ml di Fraser Broth (FB).
- Incubare le provette di Fraser Broth a 37°C per 48 ore.

3°giorno:

- Lettura delle piastre ALOA e Oxford.

4° giorno:

Sottocoltura dall'arricchimento su agar selettivi

- Dispensare e seminare 10 µl della brodocoltura su una piastra ALOA.
- Dispensare e seminare 10 µl della brodocoltura su Oxford.
- Incubare le piastre di ALOA e Oxford a 37°C per 24 ore.

5° giorno:

- Lettura delle piastre ALOA e Oxford.

Su ALOA:

- *L.monocytogenes*: colonie verde-blu circondate da un alone opaco.

Erica Mura

- *Listeria* spp. non monocytogenes: colonie verde-blu senza alone.

Su Oxford:

- *L.monocytogenes*: colonie scure, con centro nero infossato e circondate da un alone nero.

protocollo ISO 11290-02 (ricerca quantitativa)

1° giorno:

- Pesare 25 gr di alimento e aggiungere 225 ml di Fraser Broth Base e omogeneizzare in stomacher.
- Incubare per 1 ora a T° ambiente (25° C).
- Seminare la brodocoltura su tre piastre di Aloa rispettivamente 0,3 0,3 0,4 ml per un totale di 1 ml.
- Incubare a 37°C ±2 °C per 24/48 ore.

2° giorno:

- lettura e conta delle colonie tipiche cresciute sulle piastre di ALOA.

I ceppi con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *L. monocytogenes*, sono stati reisolati su terreno TSA e successivamente confermati mediante test fenotipici (colorazione di Gram, catalasi, ossidasi) e di identificazione biochimica. L'identificazione biochimica è stata eseguita attraverso un sistema miniaturizzato API Listeria (BioMérieux).

Per quanto riguarda la valutazione dei parametri chimico-fisici degli alimenti si è proceduto alla misurazione del pH mediante pH-metro GLP22 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) e alla misurazione dell'aW mediante Aqualab 4TE (Decagon, Pullman, WA, USA). Sulle matrici alimentari confezionate in atmosfera modificata (MAP) è stata misurata la composizione del gas dello spazio di testa mediante DanSensor Check Mate. Lo strumento ha permesso di quantificare le percentuali di O₂ e CO₂ presenti all'interno delle confezioni.

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

Gli isolati umani, alimentari e ambientali sono stati conservati a -80°C in tubi di crioconservazione con biglie nella ceppoteca del Laboratorio di Biologia molecolare della Sezione di Igiene e Medicina Preventiva.

Su tutti gli stipti di *L. monocytogenes* si è proceduto all' identificazione del sierotipo di appartenenza mediante Multiplex PCR che grazie all'utilizzo di più set di *primers* in un unica mix di PCR permette di produrre ampliconi di varie dimensioni che sono specifici per diverse sequenze di DNA target. Il protocollo operativo ha previsto, dapprima, l'estrazione del DNA dal campione mediante bollitura in microonde per 10-15 minuti. Prima della bollitura le colonie sono state stemperate in 300 µl di Tris-EDTA buffer (TE). Il DNA estratto è stato centrifugato a 10.000 rpm per 10 minuti. Successivamente, si è proceduto all' amplificazione del DNA mediante Multiplex PCR utilizzando coppie di *primers* che amplificano le regioni geniche *Imo0737*, *lmo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* e il gene *prs* utilizzato come controllo positivo, secondo quanto descritto da Doumith et al., 2004 [43]. *Imo0737* è presente nei sierogruppi 1/2a, 1/2c, 3a e 3c; *lmo1118* nei sierogruppi 1/2c e 3c; *ORF2819* è presente nei sierogruppi 1/2b, 3b e 4b; *ORF2110* nei sierogruppi 4b,4d e 4c. In particolare i *primer* utilizzati sono caratterizzati dalle sequenze di sotto riportate.

Gene target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Serovar specificity
<i>lmo0737</i>	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a, 1/2c, 3a, 3c
<i>lmo1118</i>	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev: CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906	1/2c and 3c
<i>ORF2819</i>	For: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
<i>ORF2110</i>	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b, 4d, 4e
<i>prs</i>	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	All <i>Listeria</i> species

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume pari a 25µl contenente 2U di Taq DNA polimerasi (Roche, Boehringer), trifosfati deossinucleosidici 0,2 mM (dntps), Buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂ SO₄) e MgCl₂ 2 mM. 5µl di DNA estratto è stato utilizzato per ogni reazione. Sono stati inclusi un controllo negativo (H₂O) e 4 controlli positivi (DNA di *L.monocytogenes* di sierotipo 1/2a, 1/2b, 1/2c, e 4b).

Protocollo di amplificazione del DNA

- Preparare una mix per N campioni in una provetta da 1,5 ml
 - 5 µl di Buffer
 - 2 µl di MgCl₂
 - 2,5 µl dntps
 - 1 µl primer Forward + 1 µl primer Reverse *lmo0737*
 - 1,5 µl primer Forward + 1,5 µl primer Reverse *lmo1118*
 - 1 µl primer Forward + 1 µl primer Reverse *ORF2819*
 - 1 µl primer Forward + 1 µl primer Reverse *ORF2110*
 - 0,2 µl primer Forward + 0,2 µl primer Reverse *prs*
 - 0,4 µl di Taq polimerasi (2 U/µl) *L. monocytogenes*
 - 3,7µl di H₂O

Aliquotare 23 µl della mix in provette da 0,2 ml

- Pipettare 2 µl di DNA estratto nella miscela PCR
- Aggiungere 2 µl di ogni Controllo alle 4 provette di controllo positive
- Aggiungere 2 µl di acqua distillata alla provetta di controllo negativa

I campioni sono stati posizionati nel blocco termico *gene Amp 9700* (AppliedBiosystem) preriscaldato e calibrato, ed amplificati secondo i seguenti parametri di amplificazione:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Initial denaturation	94 °	3 min.	1
Denaturation	94 °	40 sec.	
Annealing	53 °	1:15 min.	35 cicli
Extension	72 °	1:15 min.	

I frammenti di Dna ottenuti sono stati separati attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 2% e visualizzati attraverso un transilluminatore UV.

Successivamente tutti gli isolati di *L. monocytogenes*, sono stati analizzati mediante simplex PCR per la presenza di 7 geni codificanti i diversi fattori di virulenza e di patogenicità: proteina polimerizzante l'actina (*actA*), listeriolisina O (*hlyA*), proteina di invasione (*iap*), fosfolipasi B (*plcB*) e A (*plcA*), internaline J e C (*inlJ*, *inlC*) e il gene *prfA* che regola la trascrizione dei suddetti fattori. Il protocollo operativo ha previsto, dapprima, l'estrazione dei campioni mediante bollitura e la successiva amplificazione del DNA estratto mediante simplex PCR.

Estrazione DNA mediante bollitura

- preparare la brodocoltura stemperando gli stipiti di *L. monocytogenes* in TSB (tryptone soya broth)
- incubare la brodocoltura per 18 h a 37°C.
- Trasferire 1 ml di brodocoltura in eppendorf da 1,5 ml
- Centrifugare la coltura a 15000 g (~13000rpm) per 5 min.
- Eliminare il surnatante e risospesne il pellet batterico in 1 ml di acqua distillata sterile
- Centrifugare a 15000 g (~13000rpm) per 5 min.
- Eliminare il surnatante e risospesne il pellet batterico in 200 µl di acqua distillata sterile
- Incubare a bagnomaria a 100°C per 10 min

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

- Centrifugare a 15000 g (~13000rpm) per 1 min.
- Trasferire il surnatante in eppendorf da 1,5 ml

Per la reazione di PCR sono state utilizzate le seguenti coppie di *primers*:

Gene target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>iap</i>	For: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG Rev: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	131
<i>pclA</i>	For: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC Rev: CATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	326
<i>hlyA</i>	For: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA Rev: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456
<i>prfA</i>	For: CTGTTGGAGCTCTTCTTGGTGAAGCAATCG Rev: AGCAACCTCGGTACCATATACTAACTC	467
<i>actA</i>	For: CGCCGCGGAAATTAATAAAGA Rev: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	650
<i>inlJ</i>	For: TGTAACCCCGCTTACACAGTT Rev: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	238
<i>inlC</i>	For: AATTCCCACAGGACACAACC Rev: CGGGAATGCAATTTTCACTA	517

La reazione di amplificazione è stata allestita preparando una mix di reazione per ciascuna coppia di *primers* in un volume pari a 25µl.

Protocollo di amplificazione del DNA

Preparare una mix per ciascuna coppia di primer e per N campioni in una provetta da 1,5 ml:

- 10 μ l PCR Mastermix (5 Prime)
- 0,50 μ l Primer F (10 mM)
- 0,50 μ l Primer R (10 mM)
- 13 μ l H₂O
- 1 μ l di MgCl₂ solo nella provetta con i primer per inJ

Aliquotare 24 μ l della mix in provette da 0,2 ml

- Pipettare 1 μ l di campione nella miscela PCR

I campioni sono stati posizionati nel blocco termico Mastercycler gradient (Eppendorf) preriscaldato e calibrato. L' amplificazione del DNA è stata eseguita secondo i seguenti parametri di amplificazione:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Initial denaturation	95 °	2 min.	1
Denaturation	95 °	15 sec.	
Annealing	60 °	30 sec.	35 cicli
Extension	72 °	1:30 min.	
Final extension	72 °	10 min.	1

I frammenti di DNA ottenuti sono stati separati per mezzo dell' elettroforesi su gel di agarosio (gel 2% in TAE buffer 1X) e visualizzati in un trans illuminatore UV. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato come standard di pesi molecolari 1 Kb DNA ladder (Promega) con un tempo di corsa: 45 min. / volt: 120 V.

Allo scopo di definire le possibili relazioni di clonalità tra i ceppi di origine umana, alimentare e ambientale, si è proceduto alla caratterizzazione

genotipica degli isolati mediante *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multi Locus Sequence Type* (MLST).

La PFGE è stata eseguita facendo riferimento al protocollo adottato dal Network Pulsnet, che prevede l'utilizzo degli enzimi di restrizione AscI e ApaI e, e come ceppo di riferimento, per valutare la posizione delle bande di macrorestrizione, *Salmonella* sierotipo Braenderup (H9812). La metodica adottata ha previsto l'inclusione della sospensione batterica in dischetti di agarosio a basso punto di fusione, successivamente sottoposti a lisi per l'estrazione del DNA batterico e digestione con gli enzimi di restrizione prescelti. I dischetti di agarosio contenenti il DNA sono stati quindi incubati per 8 ore in presenza di 40U di enzima di restrizione ApaI, endonucleasi che taglia infrequentemente l'acido nucleico. I frammenti di DNA sono stati separati per mezzo di elettroforesi su gel di agarosio in un sistema CHEF (Clamped Homogeneous Electric Fields) DRII (Bio-Rad Laboratories), con impulsi iniziale e finale rispettivamente di 4s e 40s, alla temperatura di 14°C, con una intensità di campo elettrico di 6V/cm, per 20 ore.

Il gel è stato colorato con bromuro di etidio e osservato sotto un transluminatore a raggi UV. Le immagini del gel sono state rilevate ed analizzate per mezzo dell'Image Master Program (Pharmacia).

I fingerprinting ottenuti sono stati sottoposti, attraverso l'utilizzo del software Gel Compare II, ad una cluster analysis, usando il coefficiente di similarità di Dice. Inoltre, per trarre maggiori informazioni sul grado di "similarità" tra gli stipiti esaminati, ai pattern ottenuti è stato applicato il metodo U.P.G.M.A. (Unweighted Pair-Group Method of Average) che consente di raggruppare in dendrogrammi stipiti identici o molto simili tra loro.

Protocollo PFGE per *Listeria monocytogenes* (PulseNet)

Preparazione del campione:

- Ripassare e isolare i ceppi batterici batteri su piastre di terreno Brain Heart Infusion Agar (Oxoid, limited, Basingstoke, UK) e incubare a 37°C per 14-18 ore.
- Prelevare la patina batterica con un tampone sterile e sospenderla in 2 ml di TE Buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).
- Tarare lo spettrofotometro con il bianco e leggere i campioni, aggiustando la densità ottica a 610 nm in modo che la densità sia 1.00. Se la densità è troppo alta aggiungere CSB; se è bassa aggiungere colonie.

Preparazione blocchetti:

- Trasferire 400 µl della sospensione cellulare in eppendorf da 1,5ml.
- Aggiungere 20 µl di Lisozima (20mg/ml) ad ogni campione e incubare in bagnetto a 55-60°C per 10-20 minuti (predigestione).
- aggiungere 20 µl di Proteinasi K (8U di Proteinasi K 20 mg/ml pari a 400U/ml) per campione.
- Aggiungere 400 µl di agarosio 1% in TE al campione, miscelare 2-3 volte e dispensare nei plug molds (5 per campione). Fare attenzione a non formare bolle.
- Far solidificare i blocchetti a 4°C per 10min.

Fase di lisi:

- Per ogni campione preparare una falcon su cui dispensare:
 - 5 ml di soluzione di lisi (Cell lysis Buffer: 50mM Tris, 50 mM EDTA, Ph 8 + 1% Sarcosyl);
 - 25 µl di proteinasi K (20 mg/ml) Mettere i blocchetti solidificati nella soluzione di lisi.
- Disporre i blocchetti solidificati nella soluzione di lisi e porli a 54-55°C per 2h in agitazione a bagnomaria 150-175 rpm.

Lavaggio dei blocchetti:

- Tenere in caldo l'acqua distillata sterile e il TE per i lavaggi (54-55°C).
- Dopo la lisi allontanare il tampone con il tappo filtro.

- Effettuare 2 lavaggi in 10 ml di acqua distillata per 10-15 min ciascuno e incubare in bagnetto a 55°C in agitazione 175 rpm.
- Effettuare 4 lavaggi in 10 ml di TE per 10-15 min ciascuno e incubare in bagnetto a 55°C in agitazione 175 rpm
- Dopo l'ultimo lavaggio cambiare il TE e trasferire i blocchetti in eppendorf e conservarli in 1ml di TE a 4°C (possono durare anche un anno).

Taglio dei blocchetti:

- Prelevare un blocchetto con un'ansa sterile e porlo in una piastra petri. Con il bisturi tagliare 1/3 del blocchetto.

Digestione enzimatica:

Fase di prerestrizione:

- Disporre il blocchetto in una eppendorf da 1,5 ml contenente:
 - 180 µl di acqua ultrasterile;
 - 20 µl del Buffer di restrizione 10X.
- Incubare per 5-10 minuti in bagnetto riscaldato: a 37°C se il campione deve essere digerito con XbaI; a 30°C se il campione deve essere digerito con ApaI.

Fase di restrizione:

- Preparare la mix per ogni campione:
 - 177 µl di H₂O sterile
 - 20 µl di Buffer di restrizione 10X
 - 2 µl di BSA (10mg/ml) (Bovine SerumAlbumin)
 - 1 µl di ApaI (40U/ µl)
 Volume 200 µl
- Trasferire i plugs nella mix e incubare per 2 ore in bagnetto riscaldato alla temperatura appropriata per l'enzima utilizzato:
 - 25°C per ApaI;
 - 37°C per AscI e XbaI.

Preparazione del gel per la corsa elettroforetica:

- Pulire il supporto per il gel con alcool; montare il pettine e accertarsi che sia perfettamente in piano utilizzando la bolla.
- Preparare il gel di agarosio all'1% in 150 ml di TBE (tris-borate EDTAbuffer)

0,5X: pesare 1,5 g di Pulsed Field Certified Agarose in 150 ml di TBE 0,5X (7,5 ml di TBE 10X in 142,5ml di H₂O). Sciogliere al microonde e lasciarlo raffreddare.

- Preparare il tampone per la corsa elettroforetica 2200 ml di TBE 0,5X (100ml in 1900ml di H₂O) e farlo raffreddare a 14°C nell'apparato CHEF.

Impostazioni strumento CHEF-DR II

Condizioni di corsa:

- Initial switch time: 4 s
- Final switch time: 40 s
- Voltage: 6 V
- Included Angle: 120°
- Run time: 19-20 hours

Colorazione del gel:

- Per visualizzare le bande, si colora il gel immergendolo per 20-30 minuti in 400 ml di acqua pura ultrasterile contenente 40 µl di bromuro di etidio (10mg/ml).
- Decolorare il gel in H₂O per 60-90 minuti cambiando l'acqua ogni 20 minuti.
- Visualizzazione e registrazione del profilo di bande con un transilluminatore UV.

Al fine di definire il *Sequence Type* di appartenenza, gli stipiti di *L. monocytogenes* isolati sono stati sottoposti ad analisi di sequenza (MLST), condotta facendo riferimento al protocollo utilizzato dall'Istituto Pasteur, centro di riferimento dell'ECDC per il controllo delle infezioni sostenute da questo microrganismo, che prevede l'amplificazione e successiva analisi di sequenza di frammenti interni dei 7 geni housekeeping: *abcZ* (ABC transporter), *bglA* (beta glucosidase), *cat* (catalase), *dapE* (succinyl diaminopimelate desuccinylase), *dat* (D-amino acid aminotransferase), *ldh* (L-lactate dehydrogenase) e *lhkA* (histidine kinase). Per la reazione di amplificazione sono state utilizzate le seguenti coppie di *primers*:

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

Gene target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>abcZ</i>	For: TCGCTGCTGCCACTTTTATCCA Rev: CTCAAGGTCGCCGTTTAGAG	537
<i>bglA</i>	For: GCCGACTTTTTATGGGGTGGAG Rev: CCGATTAAATACGGTGCGGACATA	399
<i>cat</i>	For: ATTGGCGCATTGATAGAGA Rev: CAGATTGACGATTCCTGCTTTTG	486
<i>dapE</i>	For: CGACTAATGGGCATGAAGAACAAG Rev: CATCGAACTATGGGCATTTTTACC	462
<i>dat</i>	For: GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA Rev: CTGCGTCCATAATACACCATCTTT	471
<i>ldh</i>	For: GTATGATTGACATAGATAAAGA Rev: TATAAATGTCGTTTCATACCAT	453
<i>lhkA</i>	For: AGAATGCCAACGACGAAACC Rev: CTGGGAAACATCAGCAATAAAC	480

Per ciascuna coppia di *primers* è stata allestita una mix di reazione, per N campioni, in un volume pari a 25µl.

Protocollo di amplificazione del DNA

Preparare una mix per ciascuna coppia di primer e per N campioni in una provetta da 1,5 ml:

- 10 µl PCR hot Mastermix
- 1,2 µl MgCl₂ (25mM)
- 0,75 µl Primer F (10 mM)
- 0,75 µl Primer R (10 mM)
- 11,3 µl H₂O

Aliquotare 24 µl della mix in provette da 0,2 ml

- Pipettare 1 µl di campione nella miscela PCR

Il DNA è stato amplificato con il Mastercycler gradient (Eppendorf), utilizzando i seguenti parametri di amplificazione:

step	temperatura	tempo	cicli
Initial denaturation	94 °	4 min.	1
Denaturation	94 °	30 sec.	
Annealing	52 ° *	30 sec.	35 cicli
Extension	72 °	2 min.	
Final extension	72 °	10 min.	1

* l'amplificazione è stata effettuata ad una temperatura di annealing di 52° C per tutti i geni tranne che per *bglA* (45° C)

Successivamente si è proceduto al sequenziamento di entrambi i filamenti, utilizzando gli stessi primer usati per la precedente reazione di amplificazione, ed alla successiva analisi del sequence type grazie all'utilizzo del programma Bioedit (freeware). Il DNA amplificato è stato sequenziato mediante l' *ABI prism 3130 genetic analyser* (Applied biosystem).

Effettuato il sequenziamento, le sequenze di ciascun gene sono state inserite nel sito dell'Istituto Pasteur alle voci Single locus query e Multiple locus query, al fine di valutare la “percentuale di identità” e la compatibilità delle sequenze alleliche ottenute, che sono state successivamente confrontate con quelle depositate nella banca dati dell' Istituto Pasteur.

Su tutti stipiti di *L. monocytogenes* isolati, si è proceduto allo studio dell'antibiotico resistenza attraverso la ricerca dei geni che codificano per per la resistenza ad alcuni antibiotici: *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetS* codificano per la resistenza alla tetraciclina, i geni *ermA*, *ermB*, *ermC* per la resistenza al macrolide eritromicina, il gene *aad* per la streptomina e il gene *cat* per il cloramfenicolo. Per tutti i geni ricercati sono state eseguite delle PCR simplex utilizzando i *primers* descritti da Morvan et al. (2010) [110] di seguito riportati.

Gene target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>aad</i>	For: AGAAGATGTAATAATATAG Rev: CTGTAATCACTGTTCCCGCCT	978
<i>cat</i>	For: GAACAGGAATTAATAGTGAG Rev: GGTAACCATCACATAC	384
<i>ermA</i>	For: CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT Rev: TCTAAAAGCATGTAAAAGAA	645
<i>ermB</i>	For: GAAAAGGTACTCAACCAAATA Rev: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	636
<i>ermC</i>	For: TCAAAACATAATATAGATAAA Rev: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	641
<i>tetK</i>	For: CGATAGGAACAGCAGTATGG Rev: TTAGCCCACCAGAAAACAAACC	614
<i>tetL</i>	For: CCACCTGCGAGTACAACTGG Rev: TCGGCAGTACTTAGCTGGTGA	739
<i>tetM</i>	For: GTGGACAAAGGTACAACGAG Rev: CGGTAAAGTTCGTACACAC	405
<i>tetS</i>	For: ATCAAGATATTAAGGAC Rev: TTCTCTATGTGGTAATC	589

Per ciascuna coppia di *primers* è stata allestita una mix di reazione per N campioni in un volume pari a 25µl contenente i seguenti reagenti:

- Buffer green go taq (Promega) 10x, concentrazione finale 1x;
- MgCl₂ (Promega) 25 mM, concentrazione finale 3 mM;
- dNTPs (Sigma Aldrich) 2 mM, conc. Finale 0,2 mM;
- Primers forward e reverse (Sigma Aldrich), 1 µM ciascuno;
- taq hot start polymerase (Promega) 5U/µL, conc. Finale 1U/µL;

Il DNA è stato amplificato con il *gene Amp 9700* (AppliedBiosystem), utilizzando i seguenti parametri di amplificazione:

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Initial denaturation	94 °	5 min.	1
Denaturation	94 °	1 min.	
Annealing	50 ° *	1 min.	35 cicli

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

Extension	72 °	1 min.	
Final extension	72 °	7 min.	1

* La temperatura di annealing utilizzata è stata di 50° C per tutti i geni eccetto *tetK* (53° C), *tetL* (55° C) e *tetM* (51° C)

Gli amplificati ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agaroso (gel 2% in TAE buffer 1X) e visualizzati in un trans illuminatore UV. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato come standard di pesi molecolari il DNA ladder 1 Kb (Promega) con un tempo di corsa: 50 min. / volt: 90 V.

Per quanto concerne la caratterizzazione del profilo immunitario dei pazienti con meningoencefalite da *L.monocytogenes*, il protocollo operativo ha previsto, dapprima, l'isolamento di *L.monocytogenes* dal campione di liquor prelevato dal paziente con malattia invasiva e la successiva preparazione di diverse concentrazioni di *L.monocytogenes* tra le quali si è optato per quelle con 10, 10² e 10⁵ unità formanti colonie (UFC), scelte dopo averle testate su campioni ematici di volontari sani. *L.monocytogenes* è stata successivamente inattivata dopo incubazione a T° ambiente per 4 ore, con perossido d'idrogeno (H₂O₂). Le concentrazioni di 10, 10² e 10⁵ UFC sono state ottenute attraverso diluizioni scalari (1:10) in acqua distillata sterile a partire da una concentrazione di microrganismo di 10⁸ UFC (0,5 McFarland). Le 3 concentrazioni di microrganismo, dopo inattivazione sono state risospese ciascuno in 500 µl di *Rosewell Park Memorial Institute* 1640 Medium (RPMI), un terreno di coltura comunemente usato per mantenere le condizioni fisiologiche delle cellule bianche come i linfociti umani.

Inattivazione di *Listeria monocytogenes* con perossido d'idrogeno

- Vortexare le falcon con le concentrazioni di 10, 10², 10⁵ UFC.
- Centrifugare a 4000 rpm per 10 minuti.
- Eliminare il surnatante e aggiungere 15 gocce di acqua ossigenata al 10%.
- Vortexare e incubare a T° ambiente per 4 ore.
- Aggiungere 1ml di RPMI ad ogni falcon per diluire l'acqua ossigenata, i cui residui potrebbero uccidere i linfociti.
- Centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti.
- Eliminare l'acqua ossigenata, e aggiungere 500 µl di RPMI.
- Vortexare e trasferire il contenuto delle falcon in nuovi tubini utilizzati per la lettura al citofluorimetro.
- Conservare I tubini in frigorifero a 4° C.

Le tre concentrazioni del microrganismo inattivato sono state utilizzate per una stimolazione “ex vivo” antigene specifica dei PBMC del paziente e di un controllo sano. La stimolazione è stata eseguita senza procedere ad isolamento dei linfociti ma su sangue intero dopo prelievo venoso in provette di sodio eparina.

Protocollo di stimolazione del sistema immunitario

Per ciascun campione di sangue sono state allestite 5 provette:

1° controllo negativo (K -) o non stimolato

2° controllo positivo (K +) con uno stimolo massimale PMA +Ca ionoforo

3° 10 UFC + 500 µl di RPMI

4° 10² UFC + 500 µl di RPMI

5° 10⁵ UFC + 500 µl di RPMI

} stimolo specifico

- Trasferire 500 µl di RPMI nella provetta K – e K +
- Aggiungere al K+:

– 2,5 µl di PMA (forbolo 12-acetato 13-miristato) 25ng/ml, utilizzato per avere una stimolazione massimale del sistema immunitario.

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

- 1 µl di Ca²⁺ ionoforo
- Aggiungere 5 µl dell'anticorpo Anti-CD28/CD49d alle 3 provette contenenti le diverse concentrazioni del microrganismo. Il CD28 e il CD49d sono due molecole presenti sulla membrana dei linfociti T e sono costimolatorie dell'attivazione del recettore dei linfociti T, o TCR, e hanno come ligando la molecola B7-1/2 sui monociti. L' anti-CD28/CD49d mima l'azione della molecola B7-1/2 incrementando l'attivazione dei linfociti T in seguito all'esposizione dell'antigene da parte dei monociti, serve dunque per avere una risposta antigene-specifica più efficiente.
- Aggiungere 500 µl di sangue del paziente rispettivamente nelle prime 5 provette, e 500 µl di sangue del controllo sano nelle altre 5 provette.
- Vortexare tutte le provette e incubare per 24 h a 37° C in atmosfera di 5% di CO₂ in posizione obliqua.
- Dopo 8 ore di incubazione aggiungere alle provette contenenti le 3 concentrazioni del microrganismo:
 - l' Interleuchina2 (IL2 50 UI/ml). Questa citochina è utilizzata per mantenere una buona vitalità dei linfociti T nei tempi sperimentali prolungati come nel nostro caso (24h) in quanto è considerata come “l'ormone autocrino” dello sviluppo dei linfociti.
 - 500 µl di RPMI.
- Dopo incubazione overnight aggiungere 1 µl di Brefeldina e incubare per 4 h al buio. La Brefeldina è un inibitore dell'attività di vescicolazione dell'apparato di Golgi a livello del reticolo endoplasmatico, trattenendo in questo modo le citochine prodotte.
- Centrifugare i campioni a 1200 rpm per 10 minuti, ed eliminare il surnatante.
- Procedere alla lisi dei globuli rossi (interferiscono nella lettura al citofluorimetro) con l'aggiunta di 1 ml di *Lysing Fix Buffer* (1X) ad ogni campione. Quest'ultimo contiene cloruro di ammonio per la lisi dei globuli rossi e formaldeide (10%) per la fissazione dei leucociti.
- Vortexare e incubare al buio per 10 minuti.
- Aggiungere 3 ml di *Lysing Fix Buffer* (1X) ad ogni provetta e incubare overnight a 4° C.

- Dopo incubazione overnight aggiungere 100 μ l di saponina (0,5%) a ciascuna provetta. La saponina viene utilizzata per permeabilizzare la membrana e permettere agli anticorpi (utilizzati come marcatori) di raggiungere le citochine che sono state imprigionate dalla Brefeldina all'interno della cellula.
- Vortexare e incubare al buio per 10 minuti.
- Preparare una MIX in una eppendorf da 1,5 ml per la marcatura delle citochine, dei linfociti T e delle cellule NK con i seguenti marcatori (anticorpi monoclonali coniugati a molecole fluorescenti (MAb)):

MARCATORI	Quantità per un campione	Quantità per 10 campioni
CD3- FITC	5 μ l	50 μ l
CD8 (BW135/80)- PerCP-Vio700	5 μ l	50 μ l
CD56- PE	2,5 μ l	25 μ l
CD16- PE	2,5 μ l	25 μ l
Anti-INF- γ -PE-Vio770	5 μ l	50 μ l
Anti-IL-2- APC- Vio770	2,5 μ l	25 μ l
Anti-TNF- α -APC	2,5 μ l	25 μ l
Volume TOT.		250 μ l

- Dispensare 25 μ l di MIX in ciascuna provetta.
- Vortexare e incubare al buio per 30 minuti.
- Aggiungere 10 ml di saponina per levare l'eccesso di anticorpi.
- Vortexare e centrifugare a 1200 rpm per 10 minuti.
- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet aggiungendo 300 μ l di *Flacs Flow* (PBS o fisiologica) a ciascuna provetta e vortexare.
- Procedere alla lettura al citofluorimetro.

I campioni sono stati analizzati mediante citometria a flusso (citofluorimetro BD FACSCanto 2 laser a 6 colori). Le molecole identificate mediante anticorpi fluorescenti sono state: CD8, CD3 per i linfociti T, CD56 e CD16 per le cellule NK, NKT e per ogni sottopopolazione cellulare sono state analizzate le seguenti citochine: IL2, TNF, IFN. Le citochine sono state analizzate mediante marcatura intracitoplasmatica, mentre le molecole d'identificazione fenotipica, mediante marcatura di membrana.

Per la divulgazione dei risultati ottenuti e per la condivisione delle procedure operative e dei protocolli di ricerca utilizzati è stato predisposto un sito internet (<http://listeriaweb.uniss.it/>) a disposizione della comunità scientifica e dei consumatori per trarre informazioni utili al fine di prevenirne la diffusione.

4. RISULTATI

Nell'ambito dell'attività di sorveglianza delle meningoencefaliti batteriche, nel periodo ottobre 2013 - settembre 2016, sono pervenuti e analizzati presso il laboratorio della U.O.C. di Igiene dell'AOU di Sassari, 125 campioni tra liquor cefalorachidiano (CSF) e sangue, prelevati da pazienti con sospetta meningoencefalite di n.d.d.

Dei 125 campioni analizzati con metodiche colturali e molecolari, 6 sono risultati positivi per *L. monocytogenes*; di questi, 4 con entrambe le metodologie diagnostiche, solo due con la sola analisi molecolare.

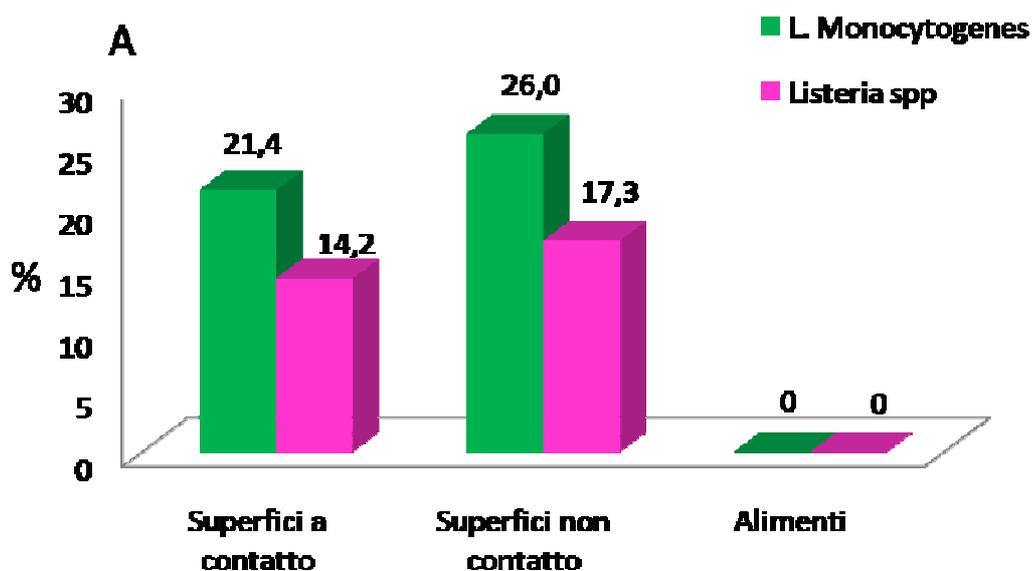
Contestualmente, nel suddetto periodo, nell'ambito di una più estesa sorveglianza epidemiologica, al fine di valutare lo stato di portatore, sono stati raccolti ed analizzati 116 tamponi fecali provenienti da soggetti con sintomatologia gastro-intestinale ricoverati nei reparti di malattie Infettive ed Ematologia dell'AOU di Sassari e da ospiti di una comunità di recupero del territorio del Nord Sardegna. Tutti i 116 tamponi fecali sono risultati negativi sia all'esame colturale che all'esame molecolare.

Per quanto riguarda lo studio di prevalenza condotto su alimenti e ambienti, nei 2 caseifici selezionati, sono stati prelevati complessivamente 62 campioni ambientali (37 caseificio A e 28 caseificio B) e 12 campioni alimentari, rappresentati da 3 campioni di ricotta salata e 3 campioni di crosta di formaggi duri prelevati presso ciascun caseificio. Nel *caseificio A* i siti risultati positivi per *Listeria* spp. sono stati: il pavimento e la canaletta della sala dove avveniva la salatura del Pecorino Romano e dei locali lavaggio formaggi, la macchina lava formaggi, il pavimento della cella di stagionatura ed i pool di superfici dei formaggi. Nel *caseificio B* i siti risultati positivi per *Listeria* spp. sono stati: il pavimento e la canaletta della

sala dove venivano lavati i formaggi e le ricotte, il pavimento di una cella frigo e la macchina lava formaggi.

Nel caseificio A, su 14 prelievi di superfici a contatto con l'alimento, il 21,4% sono risultati positivi per *L. monocytogenes*, il 14,2% positivi per *Listeria* spp mentre, su 23 prelievi di superfici non a contatto con l'alimento, il 26,0% è risultato positivo per *L.monocytogenes*, il 17,3% positivo per *Listeria* spp, mentre tutte le matrici alimentari sono risultate negative. Nel caseificio B i dati hanno evidenziato, su 12 prelievi di superfici a contatto con l'alimento, il 16,7% di positività per *L. monocytogenes*, mentre, su 16 prelievi di superfici non a contatto con l'alimento, il 31,2% di positività per *Listeria* spp. In questo caseificio, le matrici alimentari analizzate hanno mostrato una positività per *Listeria* spp pari al 22,2%.

Nel complesso, tra i campionamenti ambientali ed alimentari, sono stati isolati 15 ceppi identificati come *L.monocytogenes* (Fig.18), tutti isolati negli ambienti di produzione.



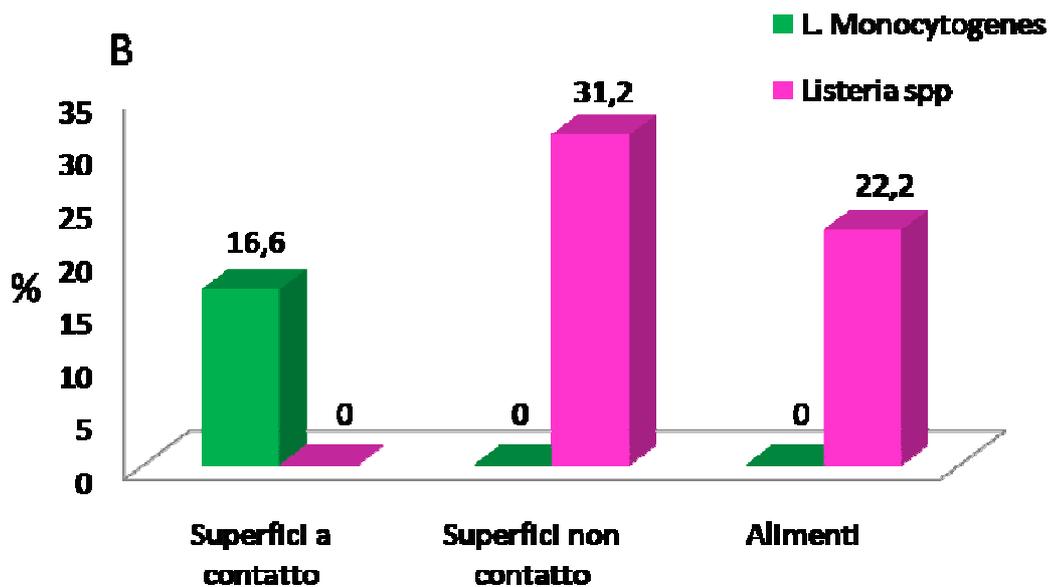


Figura 18: Prevalenza di *L. monocytogenes* negli alimenti, nelle superfici a contatto e non a contatto con gli alimenti, di 2 caseifici (A e B)

Per quanto concerne la ricerca microbiologica condotta su alimenti e ambienti della comunità di recupero di tossicodipendenti, i risultati ottenuti hanno mostrato, per il parametro Carica Mesofila Totale (CMT) a 30°C relativo alle superfici del caseificio, valori compresi tra 6,51 e 3,83 log₁₀/UFC su cm², (5,37 ± 1,09; media ± ds); relativamente alle superfici del locale di preparazione pasti valori compresi tra 6,09 e 3,30 log₁₀/UFC su cm², (4,65 ± 1,15; media ± ds); e per i campioni alimentari valori compresi tra 6,49 e 5,44 log₁₀/UFC su grammo, (5,81 ± 0,60; media ± ds). Positività per *Enterobatteriacee* è stata riscontrata in 3 campioni ambientali (21,4%): sulle superfici del caseificio, con range compreso tra 2,99 e 1,85 log¹⁰/UFC su cm² (2,24 ± 0,64; media ± ds) e su un ripiano di lavoro in acciaio della cucina (1,48 log₁₀/UFC su cm²). Inoltre, dal frigorifero, sono anche stati campionati alcuni campioni di alimenti (focacce salate, tramezzini e insalata di riso) che spesso, a fini umanitari vengono donati alla comunità. I risultati analitici hanno evidenziato, per tutti i campioni

analizzati, positività per *Enterobacteriaceae* con valori pari a 4,48 log₁₀/UFC su grammo e positività per *Pseudomonas* spp. nell'insalata di riso, con valori pari a 5,35 log₁₀/UFC su grammo. Gli stessi campioni sono, invece, risultati negativi per *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

La ricerca qualitativa di *Listeria* spp. effettuata su 55 RTEs prelevati presso i distributori automatici di 6 strutture ospedaliere, ha evidenziato una positività del 16,4% (9/55), 3 di questi (33,3%) sono stati identificati come *L.monocytogenes* (Fig. 19).

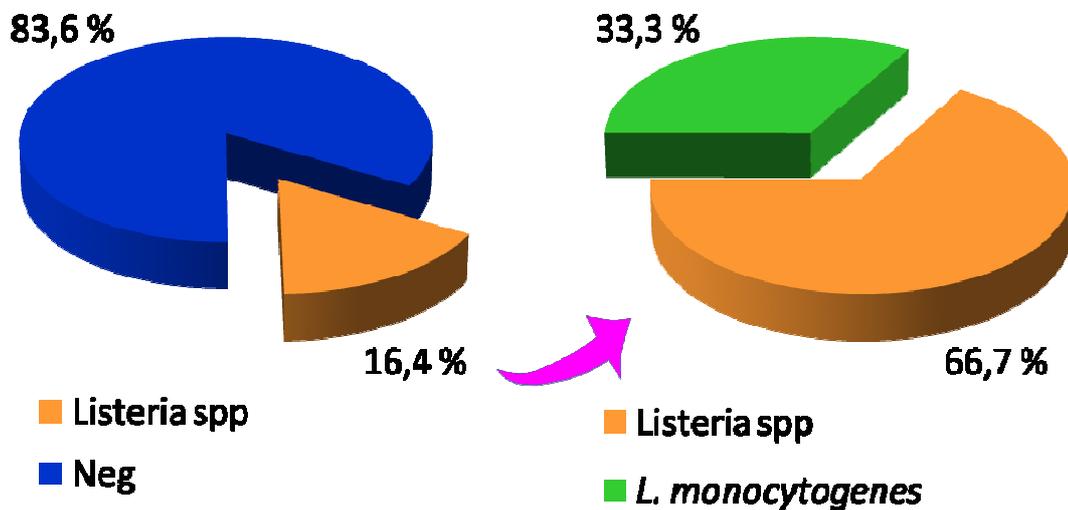


Figura 19: Prevalenza di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* in Ready To Eat Sandwiches (RTEs) commercializzati presso distributori automatici di 6 strutture ospedaliere

Dai 9 campioni positivi per *Listeria* spp., sono stati isolati complessivamente 45 stipiti; di questi, 15 (33,3%) sono stati identificati come *L.monocytogenes*, 11 come *L.innocua* (24,4%), 11 come *L.seeligeri* (24,4%), 7 *L.welshimeri* (15,5%) e 1 ceppo *L.grayi* (2,2%). Non si sono evidenziate, invece, contaminazioni sostenute da altri microrganismi.

I valori dei parametri chimico-fisici (O₂, CO₂, N, pH e aW) rilevati negli stessi campioni alimentari rientravano in range di normalità.

La carica batterica mesofila totale dei campioni analizzati ha presentato una media pari a $6,29 \pm 1,25$ (media \pm ds) con un range compreso tra 8,51 e 2,77 log/UFC su grammo. 5 campioni, 9,1% (5/55), sono risultati positivi per *Pseudomonas* spp., 15 campioni, 27,3% (15/55), per *Enterobacteriaceae*, 8 14,5% per lieviti e muffe. 25 campioni (45,5%) sono risultati positivi per la ricerca di Stafilococchi Coagulasi Negativi. In nessuno dei campioni analizzati è stata riscontrata la presenza di *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Per quanto riguarda lo studio sulla valutazione del livello di contaminazione da *L. monocytogenes* su RTE commerciali disponibili presso punti vendita al dettaglio, complessivamente sono stati raccolti 30 RTE: 8 formaggi, 2 insalate di riso, 6 prodotti di IV gamma, 7 prodotti a base di carne cotti e 7 prodotti ittici. In tutti i campioni la ricerca di *Listeria* spp secondo la metodica quantitativa ha mostrato valori inferiori al limite di sensibilità del metodo, mentre la ricerca qualitativa ha permesso di isolare un ceppo di *Listeria* spp da un campione di salmone affumicato e uno di *L. monocytogenes* da un campione di Gorgonzola e Mascarpone.

Il campionamento ambientale condotto presso il laboratorio di preparazione e somministrazione dei pasti per diverse strutture ospedaliere, su 12 campioni analizzati non ha rilevato la presenza di *L. monocytogenes*. Su un unico campione ambientale (carrello trasporto alimenti), è stata rilevata la presenza di *Enterobacteriaceae* (2,60 log₁₀/cm²), mentre su tutti i campioni la CMT era compresa tra 1,90 e 4,81 log₁₀/cm².

Complessivamente, a completamento dell'indagine, sono stati isolati 37 stipiti di *L. monocytogenes*: 6 (16,2%) di provenienza umana, 19 (51,4%) di provenienza alimentare e 12 (32,4%) di provenienza ambientale.

Tutti gli isolati sono stati analizzati per identificare il sierotipo di appartenenza, la presenza di geni di virulenza, di geni responsabili

dell'antibiotico resistenza e sono stati caratterizzati genotipicamente (PCR, PFGE, MLST) al fine di definirne le caratteristiche genomiche e le possibili relazioni di clonalità tra i ceppi di origine umana e alimentare.

La ricerca dei geni per identificare il sierotipo di appartenenza, eseguita mediante Multiplex PCR, ha permesso di identificare 3 principali sierovarianti: 19 ceppi (51,3%) appartenevano alla sierovariante 4b, 13 alla 1/2a (35,1%) e 5 (13,5%) alla 1/2b (Fig. 20). Nessuno apparteneva alla sierovariante 1/2c. Nello specifico dei 6 stipti umani, 2 appartenevano alla sierovariante 4b e 4 alla 1/2a, a confermare che il sierotipo 1/2a sta gradualmente sostituendo il 4b come sierotipo prevalentemente nei casi di listeriosi umana. Dei 19 stipti alimentari 17 appartenevano alla sierovariante 4b e 2 alla 1/2a; dei 12 stipti ambientali 7 appartenevano alla sierovariante 1/2a e 5 alla 1/2b.

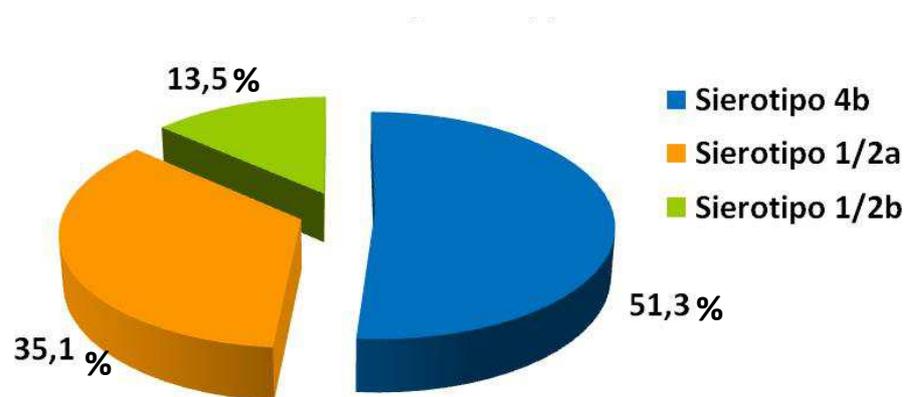


Figura 20: Sierotipo di appartenenza di 37 stipti di *L. monocytogenes* isolati da pazienti, alimenti e superfici ambientali

Tutti e 37 gli isolati sono risultati positivi per la presenza dei 7 geni di virulenza ricercati (*actA*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *prfA*, *hlyA* e *iap*) ed analizzati mediante multiplex PCR.

Per quanto concerne l'analisi di macrorestrizione (PFGE), eseguita su 37 stipiti isolati, analizzando i fingerprinting con il software GelCompare II, la cluster analysis (Fig. 21) - ottenuta applicando il coefficiente di Dice – ed applicata sui profili elettroforetici ottenuti con l'enzima ApaI, ha identificato la presenza di 5 diversi pulsotipi (A,B,C,D,E), raggruppati in due clusters: nel primo, sono raggruppati gli stipiti appartenenti ai pulsotipi A,B,C; al secondo cluster appartengono i pulsotipi D ed E. I pulsotipi A ed E sono stati rilevati da stipiti isolati sia dall'uomo che dagli alimenti; al pulsotipo C e D appartengono solo stipiti di origine ambientale; ed al pulsotipo B solo stipiti di origine umana. Complessivamente la similarità tra i 5 clusters è del 31,91%.

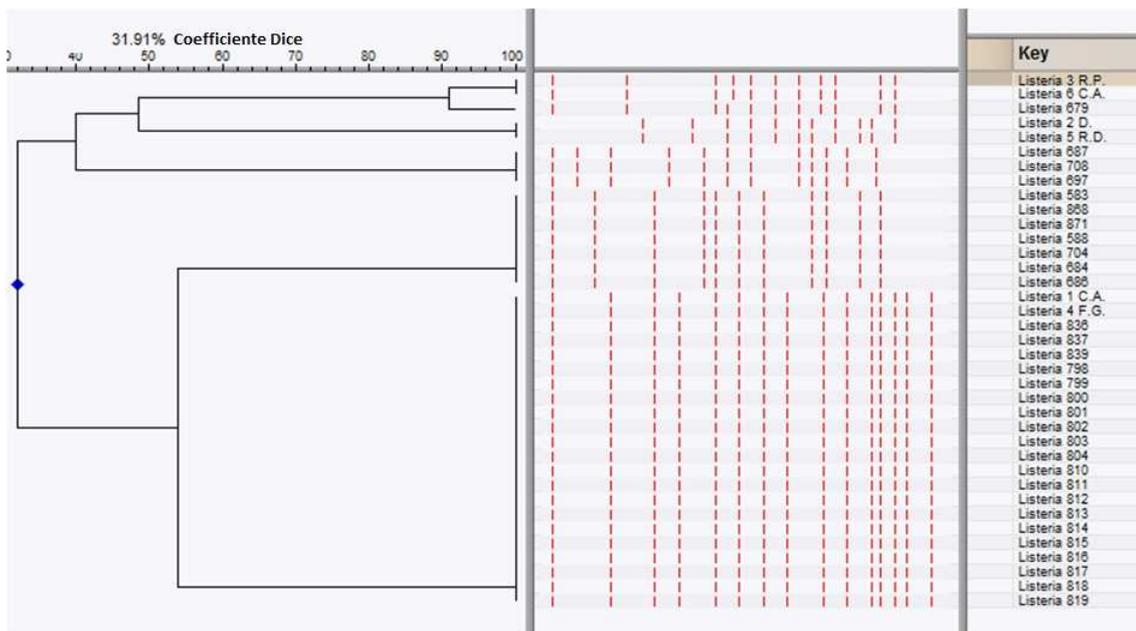


Figura 21: Cluster Analysis dei pattern di *L. monocytogenes* ottenuti con PFGE

La variabilità genomica riscontrata con la PFGE è stata confermata anche con l'analisi di sequenza (MLST) che ha permesso di distinguere 5 diversi ST: ST 1, ST 5, ST 8, ST 101, ST 121 (Fig. 22). Appare interessante

notare che gli stipiti del pulsotipo A appartengono al ST 8; quelli del pulsotipo B al ST 121; quelli del pulsotipo C al ST 5; gli stipiti del pulsotipo D al ST 101; e quelli del pulsotipo E al ST 1.

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	CC	Lineage
8	5	6	2	9	5	3	1	CC8	II

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	CC	Lineage
121	7	6	8	8	6	37	1	CC121	II

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	CC	Lineage
5	2	1	11	3	3	1	7	CC5	I

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	CC	Lineage
101	7	15	15	8	6	14	9	CC101	II

ST	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhkA	CC	Lineage
1	3	1	1	1	3	1	3	CC1	I

Figura 22: Sequence Type (ST) di *L. monocytogenes* ottenuti con la MLST

Nessuno dei ceppi isolati ha mostrato la presenza, all'interno del genoma, dei determinanti genetici ricercati che codificano per la resistenza ai suddetti antibiotici.

Per quanto concerne lo studio sulla caratterizzazione del profilo immunitario del soggetto con malattia invasiva, dai risultati ottenuti si evince che il paziente mostra una percentuale di cellule T CD8 significativamente inferiore rispetto ad un soggetto sano (6 ± 0.02 vs 19 ± 4 , $p < 0.0001$) (Fig. 13); nonostante ciò, le cellule T CD8 hanno una capacità di produrre, in seguito a stimolo specifico determinato dal microrganismo,

TNF α ed IL2 in misura significativamente superiore ai controlli (TNF α = 0.106 \pm 0.017 vs 0.225 \pm 0.015; p<0.01) (Fig. 14, 15). Tale aspetto è stato osservato alle sole concentrazioni di carica batterica pari a 10⁵ CFU mentre per concentrazioni inferiori 10, 10² CFU non si è raggiunta la significatività statistica.

Viceversa per quanto riguarda IFN γ la responsività allo stimolo specifico si evidenzia, per tutte e tre le concentrazioni considerate, un valore medio percentuale di 0.832 \pm 0.031 nel paziente e di 0.085 \pm 0.06 nel controllo sano differenza statisticamente significativa (p<0.001) (Fig. 16).

Anche per quanto riguarda il valore dei T CD4, si riscontra il medesimo decremento sul numero percentuale di cellule nei pazienti rispetto ai sani (HC vs LS 44.8 \pm 7.8 21.4 \pm 1.13), mentre invece non è stata osservata la stessa capacità per i CD8 a produrre citochine tranne che per l'IL2, ma solo alla concentrazione batterica più elevata di 10⁵ CFU (Fig. 17).

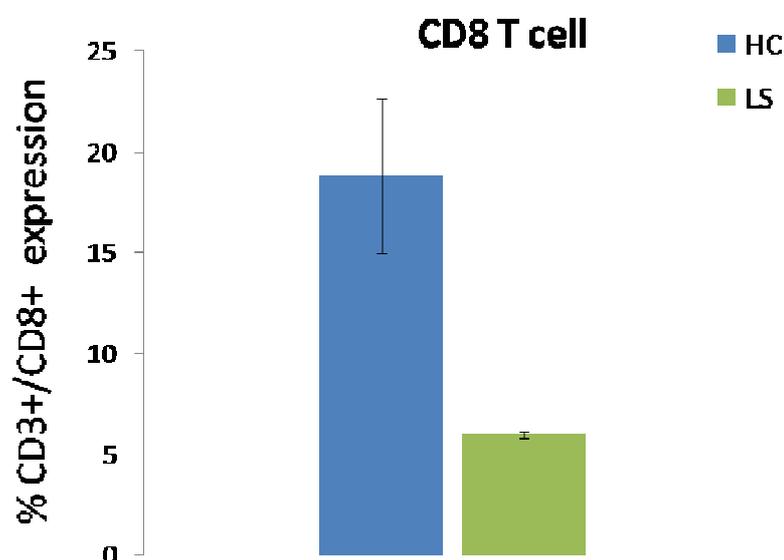


Figura 13: Percentuale totale di linfociti T CD8 nel controllo sano (HC) e nel paziente affetto da Listeriosi (LS)

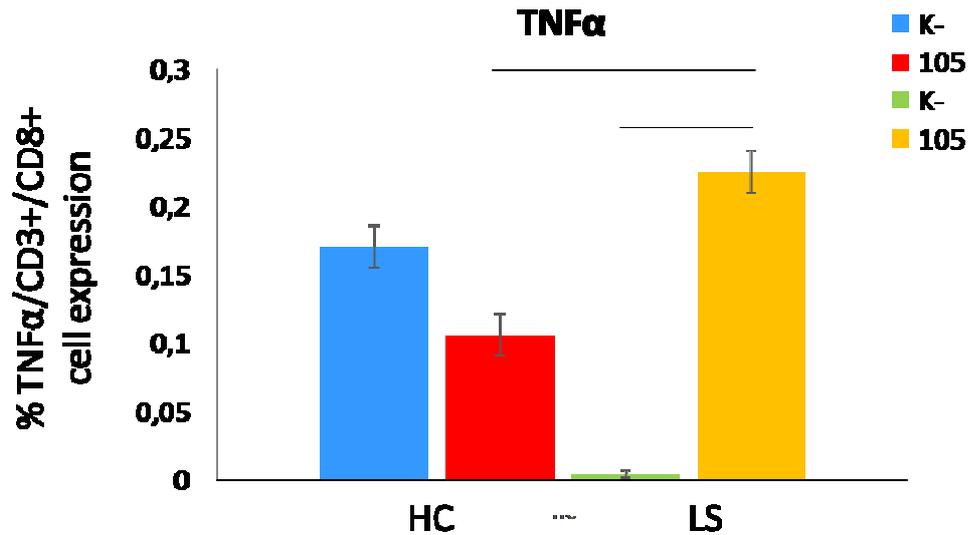


Figura 14: Percentuale di cellule T CD3+CD8+ che esprimono TNFα. Le reti che sovrastano le barre mostrano le significatività tra: a) il controllo non stimolato (K-) e stimolato alla concentrazione di 10⁵ UFC del paziente (LS) e b) tra campioni HC e LS entrambi stimolati alla concentrazione di 10⁵ UFC (HC: 0.106±0.017 vs LS: 0.225±0.015; p<0.01)

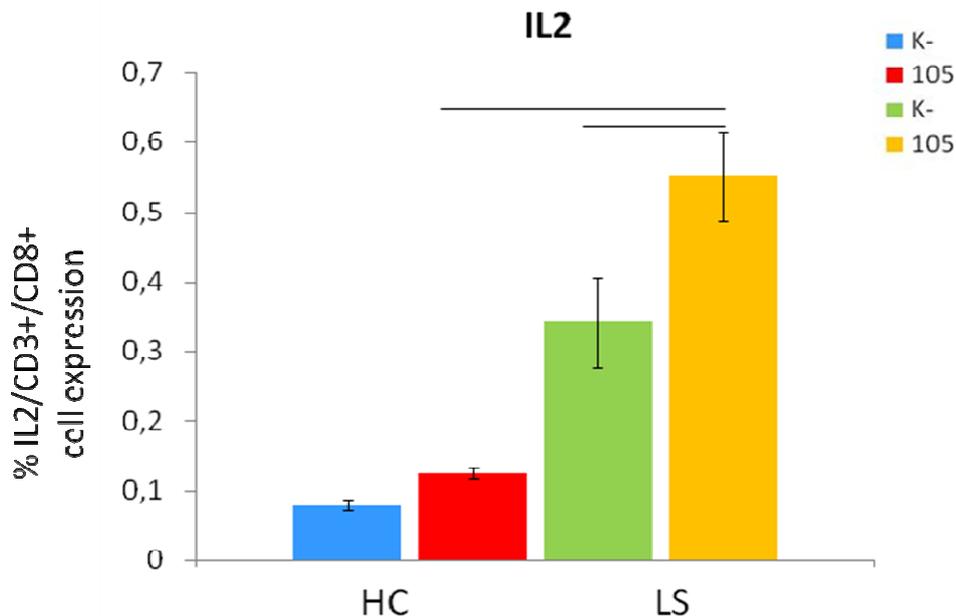


Figura 15: Percentuale di cellule T CD3+CD8+ che esprimono IL2. Le reti che sovrastano le barre mostrano le significatività tra: a) il controllo non stimolato (K-) e stimolato alla concentrazione di 10⁵ UFC del paziente (LS) (P=0,030) e b) tra campioni HC e LS entrambi stimolati alla concentrazione di 10⁵ UFC (P=0,0095)

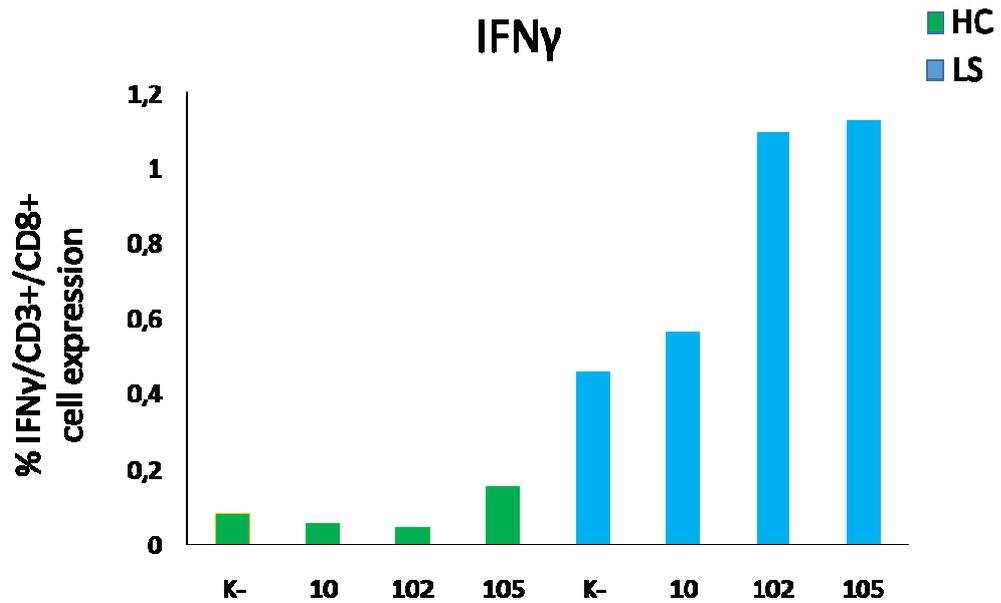


Figura 16: Percentuale di cellule T CD3+CD8+ che esprimono IFN γ nel controllo sano (HC) e nel paziente affetto da Listeriosi (LS)

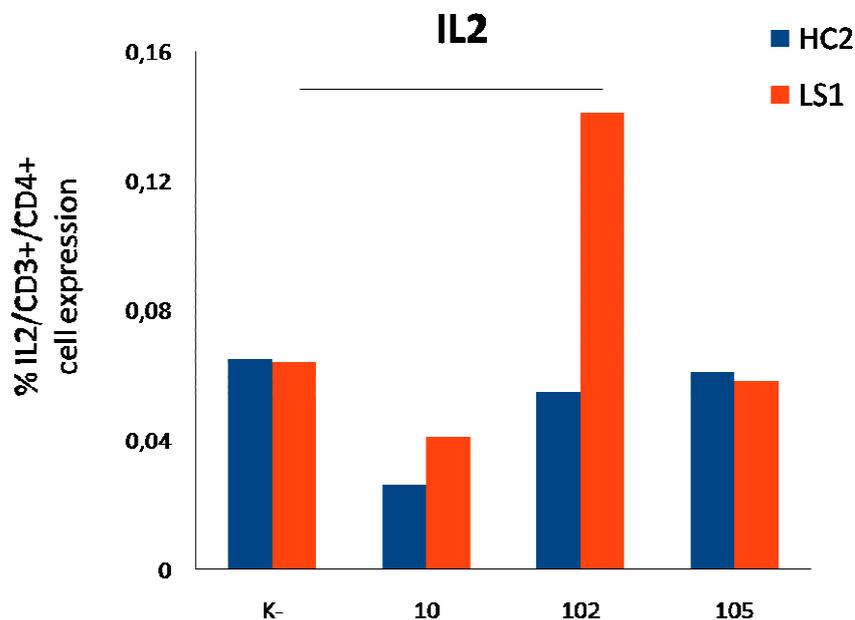


Figura 17: Percentuale di cellule T CD3+CD4+ che esprimono IL2. La rete che sovrasta la barra mostra le significatività tra il controllo non stimolato (K-) e stimolato alla concentrazione di 10^2 UFC del paziente (LS) (LSk- vs LS 10^2 p=0,0020)

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La listeriosi, considerata una delle più gravi malattie infettive a trasmissione alimentare, pur essendo un'infezione poco frequente, quando si manifesta clinicamente sotto forma di meningite o meningoencefalite, fa registrare tassi di letalità non trascurabili (20-30%).

Nell'ambito delle malattie trasmesse da alimenti, 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 [183].

È importante sottolineare come le indagini epidemiologiche sui casi di listeriosi risultino spesso molto complesse a causa di una serie di fattori legati alla ecologia di *L. monocytogenes* (ampia diffusione e persistenza ambientale del microrganismo e possibile contaminazione di prodotti alimentari caratterizzati da una lunga *shelf-life*) e alle caratteristiche della popolazione a rischio (il lungo periodo d'incubazione, fattori predisponenti).

Per tali motivi a livello globale, sia nella Comunità Europea che negli Stati Uniti, sono state istituite delle reti di sorveglianza per rendere più efficiente l'identificazione dei casi di listeriosi e per limitarne l'incidenza [162].

Nell'ambito dell'attività di sorveglianza delle meningoencefaliti batteriche è stato osservato che nei pazienti con sospetta meningoencefalite di n.d.d. è spesso difficile risalire all'agente eziologico responsabile. Le motivazioni sono attribuibili ad una serie di fattori: coorte sintomatologica è in molti casi sfumata e spesso diversificata, caratterizzata da rigidità nucale, mal di

testa, sensorio torpido, vomito, febbre, segni e/o sintomi, sicuramente non esaustivi nell'orientare la diagnosi.

Per tali motivazioni, al momento del ricovero, subito dopo avere eseguito la rachicentesi, tali pazienti vengono sottoposti a terapia antibiotica ad ampio spettro di azione nei confronti di diversi agenti eziologici.

In questo contesto, la diagnosi molecolare risulta essere di fondamentale importanza in quanto consente di poter assegnare la terapia antibiotica più opportuna, aspetto particolarmente importante in considerazione della resistenza innata della *L. monocytogenes* alle cefalosporine di III generazione, farmaci di prima scelta per la terapia empirica delle meningiti batteriche.

Altro aspetto importante è rappresentato dal fatto che spesso l'esame colturale risulta negativo in quanto il microrganismo può essere presente in carica microbica modesta. Per tali motivazioni, sarebbe necessario avere a disposizione volumi di liquor sufficientemente elevati (2 ml) aspetto che molto spesso non è possibile assicurare per le difficoltà intrinseche alla rachicentesi.

Per la prima volta nel Nord Sardegna si è proceduto al confronto tra ceppi di origine alimentare, ambientale e umana, confermando l'elevata eterogenicità relativa alla patogenicità di *L. monocytogenes* con la diffusione di ceppi iper e ipovirulenti.

In linea con quanto riportato in letteratura [104; 133], i risultati ottenuti nel presente studio confermano un cambiamento epidemiologico nella diffusione dei ceppi di *L. monocytogenes* responsabili di listeriosi invasive: il sierotipo 4b, riportato come responsabile in numerosi casi clinici, mostra un trend in diminuzione a favore del sierotipo 1/2a, descritto in passato come quello maggiormente diffuso nelle matrici alimentari e ambientali [136; 164]. Altro aspetto interessante da un punto di vista epidemiologico è

rappresentato dal fatto che ceppi di origine alimentare e isolati da casi clinici sono caratterizzati da stessi *sequence type* di appartenenza. A tale proposito sarebbe interessante estendere l'indagine su un più ampio territorio regionale al fine di disporre di dati epidemiologici maggiormente informativi.

I risultati relativi alla valutazione del grado di contaminazione degli alimenti commercializzati e degli stabilimenti di produzione mostrano una, seppur contenuta, contaminazione da *L. monocytogenes*. Infatti, anche se tutti i prodotti RTE esaminati erano conformi ai criteri microbiologici stabiliti dalla Comunità Europea [139], la loro distribuzione presso strutture ospedaliere determina situazioni di rischio potenziale per soggetti a rischio. Tale osservazione evidenzia la necessità di programmare piani di campionamento ambientale, quale utile strumento di verifica in sede di autocontrollo, necessari per prevenire quanto possibile l'eventuale trasferimento della contaminazione agli alimenti prodotti.

Allo stesso tempo, risultano indispensabili interventi di educazione sanitaria alimentare rivolti a tali soggetti che dovrebbero essere accuratamente informati sul regime alimentare da seguire. Infatti, il consumo non controllato di questi prodotti, innocui per i consumatori sani, possono risultare potenzialmente nocivi per consumatori con sistema immunitario deficitario o in alcuni casi compromesso.

Per quanto concerne lo studio sull'imbalance immunitario condotto su un soggetto con listeriosi invasiva, i risultati ottenuti dalla stimolazione "ex vivo" antigene specifica dei PBMC sul sangue di tale soggetto, hanno mostrato che il paziente ha manifestato una buona responsività al richiamo dello stimolo batterico, con attivazione delle cellule citotossiche CD8+, attività che, tuttavia, non è seguita da una idonea attivazione degli helper CD4+; tale aspetto fa presumere una incapacità del paziente di sollecitare

l'intera copertura immunitaria in quanto sono i CD4 le cellule che per prime rispondono alla produzione di IL1 ed IFN γ quando le cellule monocitarie vengono infettate da *L. monocytogenes* in "vivo". Per quanto concerne i CD8, nonostante questi fossero in numero inferiore rispetto ad un soggetto sano sembrano responsive nei confronti anche del batterio inattivato, con una buona produzione citochinica, tuttavia non sufficiente da stimolare i T CD4.

È da rimarcare, come già descritto in letteratura [115], che la riduzione della risposta infiammatoria, o per immunodeficienza o per trattamento antibiotico, rimodella la risposta delle cellule T CD8 in tutte le sue fasi di espansione, contrazione e generazione di memoria immunologica. D'altro canto, una prima infezione ha la capacità di attivare una risposta di un numero esiguo di T CD8 [150], in seguito a stimolazione antigene-specifico a diverse concentrazioni di *L. monocytogenes* (CFU10, 10^2 , 10^5). Inoltre, la risposta antigene-specifica è tanto più duratura quanto permane la presenza dell'antigene e dipende anche dalla carica batterica infettante. Infatti nella nostra indagine si è osservato proprio per i T CD8 una produzione di TNF α significativamente più alta con uno stimolo specifico di microrganismo pari a 10^5 CFU. Le cellule T CD8 sono, inoltre, capaci di sostenere la risposta immunitaria anche senza la presenza del patogeno tramite cellule di memoria e mediante la produzione di citochine ("terzo segnale"). È importante sottolineare che la capacità dell'ospite di rispondere all'infezione da *L. monocytogenes*, in termini di generazione di memoria CD8, è fortemente influenzata dall'ambiente infiammatorio. Normalmente la presenza del patogeno stimola la produzione di IL2 da parte dei T CD8 (in seguito a IL12 o IFN γ), la quale sostiene la fase di espansione clonale, seguita da una fase di contrazione (riduzione del n° di cellule) che genera il pool di cellule T CD8 di memoria. In presenza di uno

stato infiammatorio, gli elevati livelli di IL2 ad alta affinità, sostenendo una continua proliferazione cellulare, ostacolano la fase di contrazione compromettendo la generazione di una memoria che è strettamente correlata alla durata della contrazione. Questo aspetto risulta essere importante ai fini terapeutici.

Infatti, poichè l'infezione da *L. monocytogenes* determina una risposta dell'ospite in diversi tempi (espansione, contrazione, memoria), fortemente influenzati dall'ambiente infiammatorio, è necessario utilizzare diverse strategie di trattamento a seconda che si tratti di individui immunodepressi o con patologie autoimmuni. Nel primo caso si potrebbe pensare di agire sulla fase di memoria mediante l'utilizzo di cellule dendritiche ingegnerizzate con un "coating" di peptidi; nel secondo caso si potrebbe pensare di agire modulando direttamente l'infiammazione.

In conclusione, i risultati ottenuti rappresentano un importante strumento in sanità pubblica, evidenziando l'importanza dei programmi di sorveglianza attiva quale strumento fondamentale per valutare l'incidenza della listeriosi e descrivere le caratteristiche molecolari degli stiptipi di *L.monocytogenes* isolata dall'uomo, dagli alimenti e dall'ambiente nel territorio interessato. È importante sottolineare come l'adozione di metodi di subtipizzazione rappresentino un insostituibile strumento [104] per supportare la sorveglianza, in quanto consentono di caratterizzare gli isolati clinici, di evidenziare la presenza di *cluster*, di confermare o escludere l'associazione con prodotti alimentari sospetti e di risalire all'origine della contaminazione del prodotto lungo la catena alimentare.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Adzitey F. and Huda N. *Listeria monocytogenes* in foods: incidence and possible control measures, *African Journal of Microbiology Research*, 2010; 2848-2855
2. Aké FM, Joyet P, Deutscher J, Milohanic E. Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.*, 2011. 81(1):274-93
3. Allerberger F and Wagner M. Listeriosis: a reemergent foodborne infection, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010. 16:16-23
4. Allerberger F, Bago Z, Huhulescu S, Pietzka A. Listeriosis: the dark side of refrigeration and ensiling in Zoonoses. In: Sing, A. (Ed.), *Infections Affecting Humans and Animals –Focus on Public Health Aspects*, 2015. Springer Verlag Heidelberg, pp. 249–286, ISBN: 978-94-017-9456-5
5. Almualla NA, Laleye LC, Abushelaibi AA, Al-Qassem RA, Wasesa AA, Baboucarr J. Aspects of the microbiological quality and safety of ready-to-eat foods in Sharjah supermarkets in the United Arab Emirates. *J Food Prot.*, 2010. 73(7):1328-31
6. Amaya-Villar R, García-Cabrera E, Sulleiro-Igual E, Fernández-Viladrich P, Fontanals-Aymerich D, Catalán-Alonso P, Rodrigo-Gonzalo de Liria C, Coloma-Conde A, Grill-Díaz F, Guerrero-Espejo A, Pachón J, Prats-Pastor G. Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *BMC Infect Dis.*, 2010. 10:324
7. Anderson S. Sant’Ana, Bernadette DGM Franco, Donald W. Schaffner. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. *Food Control* , 2014. Vol. 42, Pages 1–8
8. Annual Epidemiological Report–2012 in www.ecdc.europa.eu
9. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2007, in www.ecdc.europa.eu
10. Arcangeli, G., (2006). Scheda regione Veneto

11. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med.*, 2000. 27. 342(17):1236-41
12. Belessi CE, Gounadaki AS, Schwartzman S, Jordan K, Skandamis PN. Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011. 145:53-60
13. Bennett, PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, *Br. J. Pharmacol*, 2008.153: S347–S357
14. Bertrand S, Huys G, Yde M, D’Haene K, Tardy F, Vrints M, Swings J, Collard JM. Detection and characterization of tet (M) in tetracycline resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France, *J. Med. Microbiol*, 2005. 54:1151e1156
15. Bertsch D, Anderegg J, Lacroix C, Meile L, Stevens MJA. pDB2011, a 7.6 kb multidrug resistance plasmid from *Listeria innocua* replicating in Gram-positive and Gram-negative hosts, *Plasmid*, 2013. 70: 284e287
16. Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, Meile L, *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese, *Int J Syst Evol Microbiol*, 2013.
17. Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. *Listeria monocytogenes* Internalin and E-cadherin: From Bench to Bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. 1(4):a003087
18. Boni P, Vio P, Pagliuca G, Trevisani M, Allegranzi B, Dalla Ponza, Busani L, Daminelli P, Finazzi G, Ravarotto L. Metodi di tutela sanitaria delle produzioni alimentari di nicchia e di protezione della popolazione umana dalle pandemie di origine animale. 2006, Società italiana di medicina veterinaria preventiva, pp 57-79
19. Bortolussi R. Listeriosis: a primer, Canadian Medical Association, 2008; 795-797.
20. Bruno JC Jr and Freitag NE. Constitutive activation of PrfA tilts the balance of *Listeria monocytogenes* fitness towards life within the host versus environmental survival. *PLoS One*, 2010. 5(12):e15138

21. Buchholz U, Mascola L. Transmission, pathogenesis and epidemiology of *Listeria monocytogenes*, *Infectious Diseases in clinical practice*, 2001; 34-41
22. Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O. et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.*, 2002. 10 (5): 238-245
23. Caly D, Takilt D, Leuret V, Tresse O. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009. 49:751-6
24. Chan YC, 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
25. Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. Listeriosis, a rare but severe foodborne infection. *Rev Prat.*, 2009. 59(7): 905-11
26. Charpentier E and Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. 43:2103–2108
27. Chaturongakul S, Raengpradub S, Wiedmann M, Boor KJ, Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*, *Trends Microbiol*, 2008; 16 (8): 388–396
28. Chen JS, Jiang LL, Fang WH. Virulence determinants and its evolution of the genus *Listeria*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.*, 2007. 47(4):738-42
29. 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
30. CIFOR-Guidelines for foodborne disease outbreak response, Chapter 2, in www.cifor.us
31. Condotta SA, Richer MJ, Badovinac VP, Harty JT. Probing CD8 T cell responses with *Listeria monocytogenes* infection. *Adv Immunol*. 2012;113:51-80.
32. Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Lanieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*, *Int J Food Microbiol*, 2009. 128(3):497–500

33. Corr S, Hill C, Gahan CG. An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of *Listeria monocytogenes* across M cells. *Microb Pathog.*, 2006. 41(6):241-50
34. Cossart P, Toledo-Arana A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 2008. 10,1041–1050 10.1016
35. Cross LJ, Russell JE, Desai M. Examining the genetic variation of reference microbial cultures used within food and environmental laboratories using fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *FEMS Microbiol Lett.*, 2011. 321(2):100-6
36. Cruz-Chamorro L, Puertollano E, de Cienfuegos GA, Puertollano MA, de Pablo MA. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* during a secondary infection in a murine model fed dietary lipids. *Nutrition*, 2011. 27(10):1053-60
37. De Las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK, Vazquez Boland JA. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander, *Current opinion in Microbiology*, 2011; 14: 118-127.
38. den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado M.R., Wiedmann M. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, 2010. 2:11-68
39. Deng X, Phillippy AM, Li Z, Salzberg SL, Zhang W. Probing the pan-genome of *Listeria monocytogenes*: new insights into intraspecific niche expansion and genomic diversification. *BMC Genomics*, 2010. 11:500
40. Doganay M. Listeriosis: clinical presentation, *Immunology and Medical Microbiology*, 2003; 173-175.
41. Dongyou Liu. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborn pathogen, *Journal of medical Microbiology*, 2005; 645-659.
42. Donnelly GW, Brackett RE, Doores S, Lee WH, Lovett J. *Listeria*, in *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Third Edition,

Edited By Vanderzant C. and Splittstoesser D. F., American Public Health Association, 1992. 637-663

43. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*, 2004. 42(8):3819-22
44. Doyle MP, Loneragan GH, Scott HM, Singer RS. Antimicrobial resistance: challenges and perspectives, *Compr. Rev. Food Sci. F*, 2013. 12: 234e248
45. ENTERNET *Listeria monocytogenes*
46. 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 improve laboratory surveillance of *Salmonella* infections, *PLoS One* 2012. 7(5):e36995
47. Farber JM, Peterkin PI. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products, in ET Ryser, EH Marth. *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 505-564
48. Fayol L, Beizig S, Le Monnier A, Lacroze V, Simeoni U. Neonatal meningitis due to *Listeria monocytogenes* after 3 weeks of maternal treatment during pregnancy. *Arch. Pediatr.*, 2009. 16:353-6
49. Feng Y, Wu S, Varma JK, Klena JD, Angulo FJ and Ran L. Systematic review of human listeriosis in China, 1964–2010, *Tropical Medicine and International Health*, 2013. vol. 18, no. 10, pp. 1248–1256
50. Fenlon DR, *Listeria monocytogenes* in the natural environment, in Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 2: 21-37
51. films. *J Food Sci.*, 2011. 76(1):22-6
52. FoodNet 2014 Annual Foodborne Illness Surveillance Report in www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2014.html
53. Freitag NE, Port GC, Miner MD. *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen, *Nat Rev Microbiol*, 2009.
54. Gandhi M, Chikindas ML. “*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive”. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007. 113, 1-15

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

55. Garner D, Kathariou S. Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *J. Food Prot.*, 2016. 79 337–344. 10.4315/0362-028X.JFP-15-387
56. Geornaras I and Holy AV. Antimicrobial susceptibility of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing, *Int J Food Microbiol*, 2001. 70: 29–35
57. Gilbert P and McBain AJ. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003. 16:189-208
58. Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G, Tyler S, Kent H, Trout-Yakel KM, Larios O, Allen V, Lee B, Nadon C. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics.*, 2010.18;11:120
59. Girardin H, Morris CE, Albagnac C, Dreux N, Glaux C, Nguien-The C. Behavior of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporigenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005. Vol. 54: 287-295
60. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003. 47: 704e708
61. Gómez D, Ariño A, Carramiñana Juan J, Rota C, Yangüela J. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the meat industry, *Food Control*, 2012. 27:242e247
62. Gómez D, Azón E, Marco N, Carramiñana Juan J, Rota C, Ariño A, Yangüela J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment, *Food Microbiology*, 2014. 42: 61e65
63. Gormley FJ, Little CL, Grant KA, de Pinna E, McLauchlin J. The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and specialty food shops: a UK wide study with a focus on *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2010.27(2):243-9.

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
 Tesi di dottorato in Scienze biomediche
 Università degli Studi di Sassari

64. Gouin E, Mengaud J, Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a non pathogenic species. *Infect. Immun.*, 1994. 62: 3550–3553
65. 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
66. Goulet V, Herbert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, Valk H. De, Desenclos JC. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis, *Clinical Infectious Diseases*, 2012; 652-660
67. Granier SA, Moubareck CC, Lemire A, Roussel S, Dao TT, Courvalin P, Brisabois A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period, *Appl Environ Microbiol*, 2011. 77: 2788-2790
68. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders BD. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2010. 60:1280-8
69. Graves LM, Swaminathan B, Hunter SB. Subtyping *Listeria monocytogenes*, in ET Ryser, EH Marth. *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 3rd edition, 2007; 283-299
70. Gray MC, Freitag NE, Boor KJ. 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
71. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scotti M, Disson O, Berche P, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Lecuit M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(1):136-8.
72. Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Kärst U, Jänsch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Kreft J, Klumpp J, Loessner MJ, Dorscht J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, Jacquet C, Martin P, Cossart P, Rusniok C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W,

- Chakraborty T. Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007. 297:541-57
73. Hedberg C. *Listeria* in Europe: the need for a European surveillance network is growing, *Eurosurveillance*, 2006; Vol. 11, 75-76
74. Hof H. *Listeria monocytogenes*: a causative agent of gastroenteritis?, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001; 369–373.
75. Hof H. *Listeriosis*: therapeutic options, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003b. 35: 203–205
76. Huang B, Fang N, Dimovski K, Wang X, Hogg G, Bates J. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. *J Clin Microbiol*. 2011.49(1):426-9
77. Huang YT, Liao CH, Yang CJ, Teng LJ, Wang JT and Hsueh PR. *Listeriosis*, Taiwan, 1996–2008, *Emerging infectious diseases*, 2011. vol.17, no.9: pp. 1731–1733
78. Ivanek R, Gröhn YT, Wiedmann M, *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host population: review of available data for mathematical modeling, *Food borne pathogens and disease*, 2006. Vol. 3, No 4: 319-336
79. Jackson KA, Iwamoto M, Swerdlow D. Pregnancy-associated listeriosis, *Epidemiol. Infect.*, 2010, 1503-1509.
80. Jadhav S, Bhawe M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Microbiological Methods*, 2012. 327-341
81. James M. Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. *Modern Food Microbiology* 7 ed. 2005
82. Jay J, Loessner Martin J, Golden David A. *Microbiologia degli alimenti*. Ed. italiana Andrea Pulvirulenti. Springer New York, 2009
83. Jemmi T, Stephan R, *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator, *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootic)*, 2006; 571-580
84. Jiang Z, Neetoo H, Chen H. Control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using chitosan-based antimicrobial coatings and

85. Kanakiraman V. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment and prevention, *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 2008; Vol. 1, No. 4; 179-185.
86. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 2002. Vol. 65, 11: 1811-1829
87. 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
88. Kovacevic J, Sagert J, Wozniak A, Gilmour MW, Allen KJ. Resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments, *Food Microbiology*, 2013. 34(2):319-27
89. Kumar R. Modern Trends to Investigate Food Borne Listeriosis. *J Food Technol*, 2011. 9(1):9-17
90. Kushwaha K, Muriana PM. Adherence characteristics of *Listeria* strains isolated from three ready-to-eat meat processing plants. *J Food Prot.*, 2009. 72(10):2125-31
91. 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 *Listeria monocytogenes*, *J Clin Microbiol*. 2015. 02344-15
92. La Placa. *Listeria monocytogenes*, in *Principi di Microbiologia medica – Ottava Edizione*, Società Editrice Esculapio, Bologna, 2000, pag. 250-252
93. Laciari AL, Vaca Ruiz ML, Le Monnier A. Neonatal *Listeria*-meningitis in San Luis, Argentina: a three-case report. *Rev. Argent. Microbiol.*, 2011. 43(1):45-7
94. Lamont RF, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Kim SK, Uldbjerg N, Romero R. Listeriosis in Human pregnancy: a systematic review, *J. Perinat Med*, 2011; 227-236
95. 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.
96. Lecuit M. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect.*, 2007. 9:1216–1225

97. Lismond A, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP, Courvalin P, VanBambeke F. Cooperation between prokaryotic (Lde) and eukaryotic (MRP) efflux transporter in J774 macrophages infected with *Listeria monocytogenes*: studies with ciprofloxacin and moxifloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2008. 52:3040e3046
98. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods*. 2007; 71(2):133-40
99. Liu D. *Handbook of Listeria Monocytogenes*, 2008. CRC Press Taylor & Francis Group
100. Lund BM, O'Brien SJ. The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people, *Foodborne Pathogens and disease*, 2011; Vol. 8, No. 9, 961-973
101. Maddeo M, Musumeci R, Careddu AML, Amato E, Pontello MM, Cocuzza CE. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in northern Italy, 2008-2010: MIC determination according to EUCAST broth microdilution method, *Journal of Chemotherapy*, 2014. Vol0 N0:1-6
102. 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.
103. 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 USA*, 1998. 95(6):3140-5.
104. 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
105. McLauchlin J., Mitchell RT, Smerdon WJ and Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods, 2004. *Int J Food Microbiol* 92, 15–33

106. Mercanoglu Taban B, Halkman AK. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 2011. 17(6):286-7
107. Milohanic E., Jonquières R., Cossart P. et al. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol. Microbiol.*, 2001. 39 (5): 1212-24
108. Moreno L, Paixão R, Gobbi DDS, Raimundo DC, Ferreira TP, Moreno AM, Hofer E, Reis CMF, Matté GR, Matté MHJ. Characterization of antibiotic resistance in *Listeria* spp. isolated from slaughterhouse environments, pork and human infections, *Infect. Dev. Ctries* 2014. 8 (4):416-423
109. Morosi S, Francisci D, Baldelli F. A case of rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* successfully treated with linezolid, *J Infect*, 2006. 52:73–75
110. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P and Le Monnier A. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France, 2010. 54(6): 2728–2731
111. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables, in www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html
112. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility, in www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html
113. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Raw Milk Produced by Miller's Organic Farm in Pennsylvania, in www.cdc.gov/listeria/outbreaks/raw-milk-03-16/index.html
114. 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
115. Münz C, Moretta L, and Ferlazzo G, Conte R, Strowig T, Moretta A., Ratto C, Forte G, Carrega P, Lui G, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Romagnani GC, Juelke K, Falco M. Activation NK Cells upon Acquire Features of CD56dim NK Cells Display Longer Telomeres and – Killer Ig-Like Receptor CD56brightCD16, *J. Immunol.* 2007. 178:4947-4955

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

116. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol*, 1926. 29:407–439
117. Mylonakis E, Paliou M, Hohmann EI, Calderwood SB, Wing EJ. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases, *Medicine Baltimore*, 2002. 81: 260–269
118. Newell DG, 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. Foodborne diseases – The challenges of 20 years ago still persist in new ones continue to emerge, *International Journal of Food Microbiology*, 2010; S3-S15.
119. Nicholson FA, Groves SJ, Chambers BJ.. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 2004. Vol. 96, 135-143
120. Nightingale K, Lyles K, Ayodele M, Jalan P, Nielsen R, Wiedmann M. Novel method to identify source-associated phylogenetic clustering shows that *Listeria monocytogenes* includes niche-adapted clonal groups with distinct ecological preferences. *J Clin Microbiol*, 2006. 44, 3742–3751
121. Nightingale K. *Listeria monocytogenes*: Knowledge Gained Through DNA Sequence-Based Subtyping, Implications, and Future Considerations. *J. AOAC International*, 2010. Vol. 93 NO 4
122. Nyarko EB, Donnelly CW. *Listeria monocytogenes*: strain heterogeneity, methods, and challenges of subtyping. *J. Food Sci*, 2015. 80, M2668–2678
123. O'Connor L, O'Leary M, Leonard N, Godinho M, O'Reilly C, Egan J, O'Mahony R. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. *Lett Appl Microbiol*, 2010. 51:490-498
124. Olier M, Garmyn D, Rousseaux S, Lemaitre JP, Piveteau P, Guzzo J. Truncated Internalin A and asymptomatic *Listeria monocytogenes* Carriage: In Vivo Investigation by Allelic Exchange. *Infection And Immunity*, 2005. 73: 644–648
125. Olier M, Rousseaux S, Piveteau P, Lemaitre JP, Rousset A, Guzzo J. Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic

- carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2004;93:87–99
126. Olin K, Wada S, Edil BH, Pan X, Meckel K, Weber W, Slansky J, Tamada K, Lauer P, Brockstedt D, Pardoll D, Schulick R, Yoshimura K. Tumor-Associated Antigen Expressing *Listeria monocytogenes* Induces Effective Primary and Memory T-Cell Responses Against Hepatic Colorectal Cancer Metastases. *Ann Surg Oncol.* 2011. [Epub ahead of print]
127. Ooi ST, Lorber B, Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*, *Clinical Infectious Diseases*, 2005; 1327-32.
128. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.*, 2011.301(2): 79-96.
129. Oyarzabal OA, Kathariou S.(Editor). *DNA Methods in Food Safety: Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens*, 2014, Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-118-27867
130. Pérez-Díaz JC, Vicente MF, Baquero F. Plasmids in *Listeria*, *Plasmid* 8, 112e 118. 1982
131. Pini, PN, Gilbert, RJ,. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*,1988. 6, 317-326
132. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J. Pathol.*, 2006. 208 (2): 215-23
133. Pontello M, Guaita A, Sala G, Cipolla M, Gattuso A, Sonnessa M, Gianfranceschi MV. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010), *Ann Ist. Super. Sanità*, 2012; Vol. 48, No. 2; 146-150
134. Posfay-Barbe KM, Wald ER. Listeriosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2009. 14: 228-233
135. Ramaswamy V, Crescence VM, Rejith JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM, *Listeria – review of epidemiology and pathogenesis Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2007; 4-13.

136. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS et al. Listeria--review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012; 40(1): 4–13
137. Rapid Risk Assessment – 12 Febbraio 2016 Cluster di Listeriosi nella Regione Marche 2015-2016, in www.epicentro.iss.it/problemi/listeria
138. Rebagliati V, Philippi R, Rossi M, Troncoso A. Prevention of foodborne listeriosis. *Indian J Pathol Microbiol.*, 2009. 52:145-9
139. Reg. (CE) 2073/2005
140. Regolamento (CE) n.178/2002 del 28 gennaio 2002: allerta comunitaria
141. Renier S, Hébraud M, Desvaux M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ. Microbiol.*, 2011. 13(4):835–850
142. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992. 42: 171
143. Rocourt J, Cossart P. *Listeria monocytogenes*, in *Food. Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 1997. Edited by Doyle MB., Beuchat LR., Montville TJ., ASM Press., Washington D.C., 337-352
144. Rocourt J, Jacquet Ch, Reilly A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 2000; 197-209
145. Sauders, et al. Diversity of *Listeria* Species in Urban and Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol*, 2012. 78: 12 4420-4433
146. Schmid B, Klumpp J, Raimann E, Loessner MJ, Stephan R, Tasara T. Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009. 75: 1621–1627
147. Schuppler M, Loessner MJ. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *International Journal of Inflammation. Int J Inflamm.* 2010. 2010:704321
148. Seeliger HP and Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol.*, 1979.13:31–49

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

149. Seeliger HPR, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PAD, Jones D. "Listeria ivanovii sp. nov." Int. J. Syst. Bacteriol., 1984. 34:336-337
150. Shaniya H. Khan and Vladimir P. Badovinac. *Listeria monocytogenes*: a model pathogen to study antigen-specific memory CD8 T cell responses. Semin Immunopathol. 2015. 37(3): 301–310
151. Silk BJ, Date KA, Jackson KA, Pouillot R, Holt K. G, Graves LM, Ong KL, Hurd S, Meyer R, Marcus R, Shiferaw B, Norton DM, Medus C, Zansky SM, Cronquist AB, Henao OL, Jones TF, Vugia DJ, Farley MM, Mahon BE. 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
152. Sleator RD, Watson D, Hill C, Gahan CG, The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. Microbiology, 2009; 2463-2475
153. Slutsker L, Schuchat A. Listeriosis in humans, in ET Ryser, EH Marth, *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd edition, 1999; 75-95
154. Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. Bioessays, 2000. 22(12):1115-22. Review.
155. Snehal Jadhav, Mrinal Bhave, Enzo A. Palombo Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods, 2012. 88(3):327-41
156. Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE and Oliver SP. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms, Foodborne Path Dis 2005. 2: 201–211
157. Suyemoto MM, Spears PA, Hamrick TS, Barnes JA, Havell EA, Orndorff PE. Factors associated with the acquisition and severity of gestational listeriosis. PLoS One. 2010 27.5(9): e13000
158. Swaminathan B and Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis, Microbes Infect, 2007. 9(10):1236-43
159. The Community Summary Report. Food-borne outbreaks in the European Union in 2007. s.l.: © European Food Safety Authority 2009

160. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, in www.efsa.europa.eu;
161. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 EFSA Journal 2016;14(12):4634, in www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/4634
162. Todd ECD and Notermans S. Surveillance of listeriosis and Its Causative Pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control, 22, 1484-1490. 2011
163. Valderrama WB, Cutter CN, An Ecological Perspective of *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013; 53: 801–817
164. Vazquez-Boland JA, 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
165. Verghese 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. 77(10):3279-92.
166. 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.
167. Vermeulen A, Devlieghere F, De Loy-Hendrickx A, Uyttendaele M. Critical evaluation of the EU-technical guidance on shelf-life studies for *L. monocytogenes* on RTE-foods: a case study for smoked salmon. Int J Food Microbiol., 2011. 145(1):176-85
168. Voetsch AC, Angulo FJ, Jones TF, Moore MR, Nadon, C, McCarthy P, Shiferaw B, Megginson MB, Hurd S, Anderson BJ, Cronquist A, Vugia DJ, Medus C, Segler S, Graves LM, Hoekstra RM and Griffin PM. Reduction in the incidence of

invasive listeriosis in foodborne diseases active surveillance network sites, 1996-2003, Clin. Infect. Dis, 2007. 44(4):513-520

169. Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods, J Appl Microbiol, 2001. 90:517-522

170. Wellinghausen N, *Listeria* and *Erypelothrix*, in Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition, 2011; 25: 403-412

171. Wiedmann M, Roberts AJ. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis -CMLS, CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 904–918

172. Wiedmann M. Ecology of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. in natural and food associated environments. Porto. Atti XVII International Symposium on Problems of Listeriosis, 2010

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

174. Wirth TC, Martin MD, Starbeck-Miller G, Harty JT, Badovinac VP. Secondary CD8+ T-cell responses are controlled by sistemi inflammation. Eur J Immunol., 2011. 41(5):1321-33

175. Wood LM, Pan ZK, Shahabi V, Paterson Y. *Listeria*-derived ActA is an effective adjuvant for primary and metastatic tumor immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2010. 59(7):1049-58

176. www.cdc.gov/listeria

177. www.efsa.europa.eu/it/press/news/161216

178. www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/docItalia.asp

179. www.iss.it/lsta/

180. www.iss.it/lsta/index.php?lang=1&anno=2017&tipo=3

181. www.veterinariaalimenti.marche.it/Articoli/category/tossinfezioni-alimentari/7650

Erica Mura

Strategie di sorveglianza attiva e *networking* per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes*
Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

182. Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*, *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):913-20
183. www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/food_and_waterborne_disease/surveillance