

MALATTIE BATTERICHE
EMERGENTI
VEICOLATE DAGLI ALIMENTI

Listeriosi



LISTERIA MONOCYTOGENES

La *L. monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario, responsabile di infezioni opportunistiche in diverse specie animali (**circling disease bovine**), compreso l'uomo (**LISTERIOSI**).

Infezione veicolata da alimenti contaminati.

La **listeriosi umana**, contrariamente a quella animale, interessa prevalentemente soggetti con sistema immunitario alterato:

- ☐- Donne in gravidanza
- ☐- Neonati
- ☐- Anziani
- ☐- Pazienti immunocompromessi (AIDS, trapiantati, dializzati, ecc.)

LISTERIA MONOCYTOGENES

- □ Fino al 1960, la malattia causata dalla *L. monocytogenes* è stata segnalata raramente nel mondo, mentre nei 20 anni successivi sono stati riportati più di 10.000 casi di listeriosi;
- □ Dopo il 1980 sono stati segnalati migliaia di casi ogni anno in tutto il mondo;
- □ L'incremento dell' incidenza della listeriosi umana (media di 2-7 casi all'anno/milione di abitanti) va ricercato nell'aumentata associazione al consumo di alimenti contaminati ed esposizione della popolazione al microrganismo:
 - Allungamento della vita media della popolazione
 - Aumento della richiesta di alimenti pronti o da consumare dopo breve riscaldamento
- □ Causa epidemie con un elevata percentuale di mortalità (20-30%)



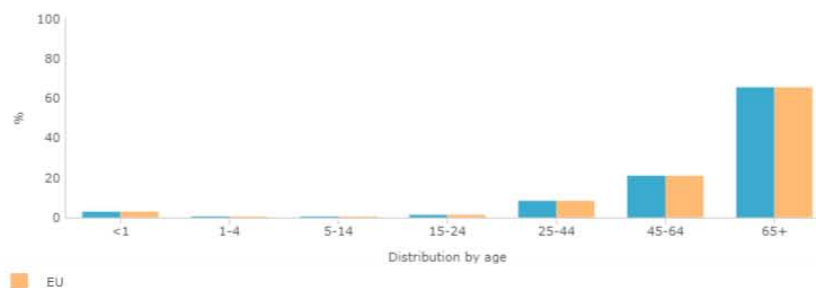
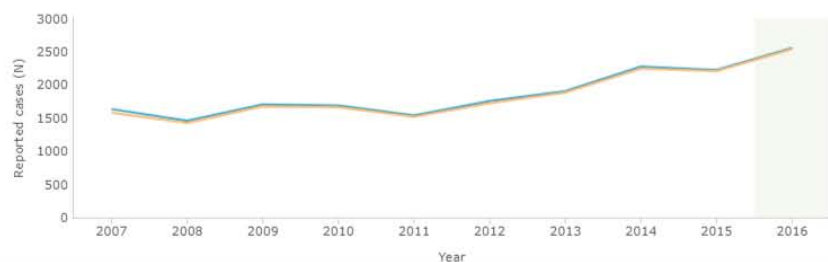
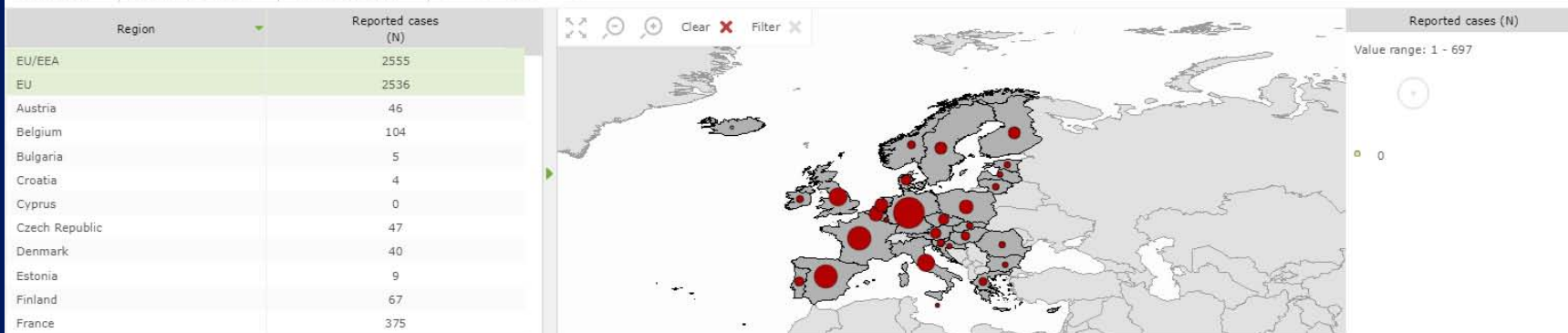
Surveillance Atlas of Infectious Diseases

Listeriosis

Confirmed cases

Reported cases

2016



179 casi in Italia nel 2016

TASSONOMIA

Superkingdom: BATTERI
Regno: EUBACTERIA
Phylum: FIRMICUTES
Ordine: BACILLALES
Famiglia: LISTERIACEAE
Genere: LISTERIA

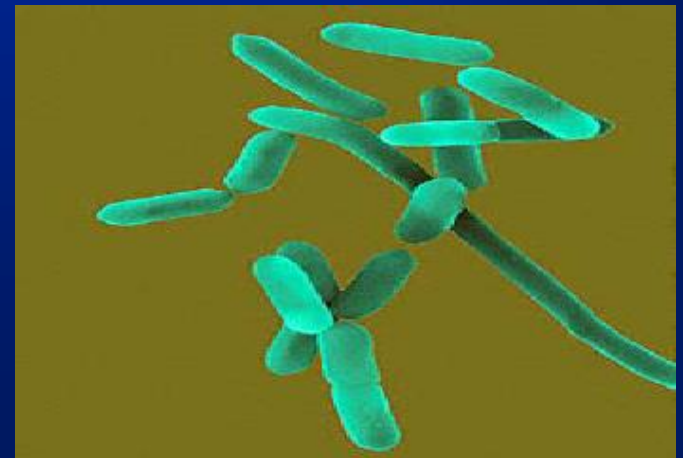
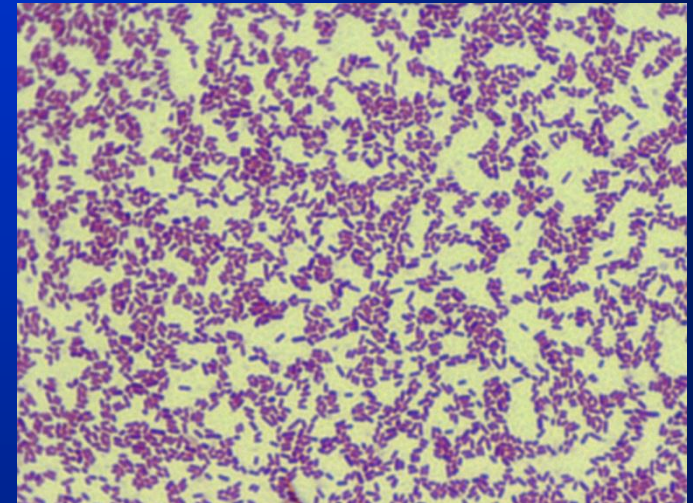


Listeria monocytogenes Transmission EM

CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE DEL GENERE LISTERIA

- □ Bastoncelli regolari (0,5 μm $\emptyset$ e 1-2 μm di lunghezza) con estremità arrotondate (singoli o riuniti in corte catene)
- □ Non sporigeni
- □ Gram +
- □ Mobili a 20-25°C per presenza di pochi flagelli peritrichi
- □ Catalasi +, Ossidasi -
- □ Anaerobi facoltativi

Colorazione di Gram di *L.m*



Fotografia al EM di *Listeria monocytogenes*
che mostra i flagelli



CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE DEL GENERE LISTERIA

- □ Crescono bene sui comuni terreni di coltura (optimum T 30-37°C; estremi 1-2°C e 45°C)
- □ pH ottimale 7 (da 4,4 a 9,6)
- □ Crescita ad elevate concentrazioni saline (>10%) e a valori di A_w <0,93



CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE DEL GENERE LISTERIA



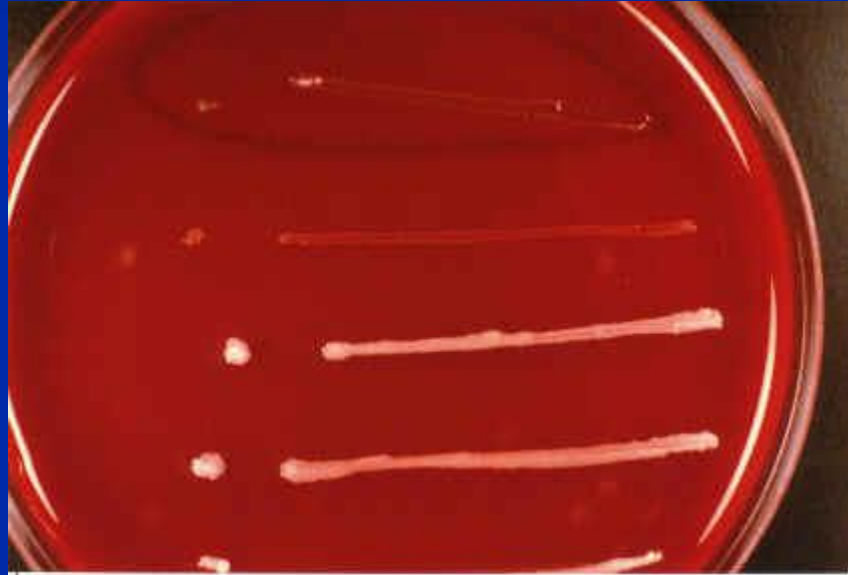
Al genere *Listeria* appartengono 8 specie:

- □ *L. monocytogenes* (patogena per uomo e animali)
- □ *L. ivanovii* (soprattutto patologie animali; serovar *L. monocytogenes* 5)
- □ *L. seeligeri*, *L. innocua* (raramente causa di infezioni)
- □ *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. denitrificans* (non associate ad infezioni)

I serovars 1/2a, 1/2b e 4b sono i più comunemente associati alla malattia

CARATTERISTICHE *L. monocytogenes*

- Isolato da conigli deceduti per leucocitosi mononucleare (Murray, 1927)
- Bastoncello, Gram +, emolitico, asporigeno
- Temperatura ottimale: 30-37°C
- Crescita ad una concentrazione salina >10%
- Produce acido ma non gas, in presenza di carboidrati
- **Resistente a congelamento, essiccamento**
- Colonie piccole, lisce di colore bianco lattescente su agar sangue
- Accrescimento favorito da sangue, liquido ascitico o glucosio



Listeria monocytogenes su agar sangue dopo 24 h di incubazione a 37°C

<http://digilander.libero.it/yurigh/link/Batteriologia/21.htm>

Considerazioni su *L. monocytogenes*

- Può essere considerata, più che un patogeno emergente in senso stretto, un **PATOGENO RICORRENTE**, essendo stato trascurato per decenni e diagnosticato più in medicina veterinaria che in medicina umana.
- Considerata inizialmente una **ZOO-ANTROPONOSI**, la **Listeriosi** viene attualmente ritenuta dagli Organismi Internazionali una **sindrome a prevalente trasmissione alimentare**
- La **LISTERIOSI** è sempre stata considerata una sindrome prevalentemente extra-intestinale, con maggiore frequenza di forme meningitiche, settiche, cutanee, e congiuntivali.
- Di particolare importanza è la **Listeriosi materno-feto-neonatale**, che si presenta nella gravida come una forma similinfluenzale, talora seguita da aborto o da una sindrome neonatale spesso sistemica (**meningite, setticemia con granulomatosi infantiseptica**).

Considerazioni su *L. monocytogenes*

- È ritenuta una affezione non comune, con una elevata letalità anche nei casi trattati (dal 5 al 33%, con una media del 22%).

Questi valori la fanno ritenere

l'infezione alimentare a maggior tasso di letalità.

- **I casi registrati in Italia**, in genere forme gravi e sporadiche, sono vistosamente sottostimati (in media 100 casi/anno), considerando che la notifica avviene di fatto solo con l'identificazione del patogeno, che si effettua per lo più solo nei casi particolarmente gravi

EPIDEMIOLOGIA

Malattia soggetta a notifica in vari paesi europei, tra cui l'Italia (classe II): DM 15 Dicembre 1990

- ▣ ▣ Italia: 50-150 casi/anno
- ▣ ▣ Regno Unito: 300 casi/anno
- ▣ ▣ Francia: 1.000 casi/anno
- ▣ ▣ Stati Uniti: 2.500 casi/anno

Patologia sottostimata, essendo il 50% delle meningiti associate ad un agente eziologico sconosciuto e non essendo stati notificati estesi episodi di listeriosi gastroenterica (es. 1997)

EPIDEMIOLOGIA

Tabella 1 - Sierotipi di *Listeria monocytogenes* identificati in Italia nel periodo 2000-09 (n. 216)

Sierotipo	Anno di isolamento										Totale
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006*	2007	2008	2009	
1/2a	2	2	7	14	8	6	8	13	22	17	99
1/2b		1	7	3		2	11	2	3	6	35
1/2c				2	1	2		2	2	1	10
3a										1	1
3b							1				1
4b	1	1	14	3		2	5	15	11	13	65
4d									1	4	5
Totale	3	4	28	22	9	12	25	32	39	42	216

(*) Anno di avvio della sorveglianza speciale in Lombardia

La raccolta dei dati di interesse epidemiologico e degli stipiti per le analisi microbiologiche è basata sull'attività di sorveglianza su base volontaria facenti capo al DSPVSA (Dipartimento di Sanità Pubblica, Veterinaria e Sicurezza Alimentare):

il sistema di sorveglianza delle malattie invasive batteriche coordinato dal Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'ISS (n. ceppi = 38); il sistema di sorveglianza Enter-Net Italia (n. ceppi = 4); un sistema di sorveglianza speciale per la listeriosi avviato in Lombardia nel 2006 per iniziativa congiunta della regione Lombardia e del Centro enterobatteri dell'Università degli Studi di Milano (in seguito chiamato CEPIS). Il sistema prevede da parte dei laboratori ospedalieri l'invio al CEPIS di tutti i ceppi di *L. monocytogenes* isolati e la compilazione di una scheda informativa, mentre da parte del laboratorio regionale prevede l'esecuzione di ulteriori analisi a scopo epidemiologico (tipizzazione molecolare) (n. ceppi = 106); contatti personali (n. ceppi = 68).

I ceppi sono stati sottoposti a caratterizzazione sierologica dal DSPVSA, secondo le tecniche di routine e facendo riferimento alla classificazione in sierotipi (7).

Considerazioni su *L. monocytogenes*

- Recentemente sono stati descritti, anche in Italia, alcuni focolai epidemici di Listeriosi caratterizzati da gastroenterite febbrile anche in soggetti immunocompetenti.
(insalata di riso, insalata di tonno e mais)
- Specialmente nei casi sporadici, la definizione eziologica, spesso risulta difficoltosa, anche a causa del lungo periodo di incubazione (fino a 90 giorni) e quindi alla mancata disponibilità dell'alimento associato all'infezione.
- *L. monocytogenes*, avendo una ampia diffusione animale ed ambientale, è un comune contaminante dei prodotti destinati all'alimentazione.
- Alcuni alimenti sono più frequentemente associati a listeriosi, come prodotti lattieri, carnei, ittici e vegetali

<http://www.salute.gov.it/portale/home.html>

Diffusione della *L. monocytogenes* dall'ambiente agli alimenti

Piante, suolo, acque

Insilati, acque reflue

Concimi

Ruminanti,
animali domestici, pollame

Carcasse e loro parti, aborti

Alimenti di origine animale e vegetale

Presenza negli alimenti

- □ **Latte crudo**, fino a 10^3 microrganismi/ml per presenza di materiale fecale negli ambienti di raccolta del latte (10^4 microrganismi/ml nel latte di mucche mastitiche);
- □ **Formaggi**, 10^5 - 10^7 microrganismi/g, dovuta a condizioni favorevoli durante i processi di maturazione (maggiore incidenza in quelli erborinati e con muffa in superficie);
- □ **Carne bovina, suina, avicola**, fino a 10 - 10^4 microrganismi/g, per contaminazione con materiale fecale durante la macellazione;
- □ **Uova** (contaminazione rara);
- □ **Vegetali**, per uso di concimi organici e acque nere per l'irrigazione;
- □ **Prodotti ittici**, in pesce di mare congelato, affumicato, (gamberi non trattati) 10^4 microrganismi/g a 4 - 10°C (il congelamento non ha nessuna influenza sulla vitalità del microrganismo).

Considerazioni su *L. monocytogenes*

- Viene inattivato dai processi di pasteurizzazione, dal trattamento con microonde, ed a pH <3.0
- Sopravvive a processi di conservazione quali raffreddamento, affumicatura, sottovuoto.

Proprietà biologiche

L. monocytogenes possiede inusuali proprietà biologiche che ne fanno un frequente inquinante dei procedimenti di preparazione e conservazione di derrate.

E' in grado di svilupparsi:

- o A temperature vicine a 0°C
- o In presenza di NaCl tra il 5-10%
- o In presenza di sodio nitrito (E250) oltre il massimo consentito nei cibi cotti.

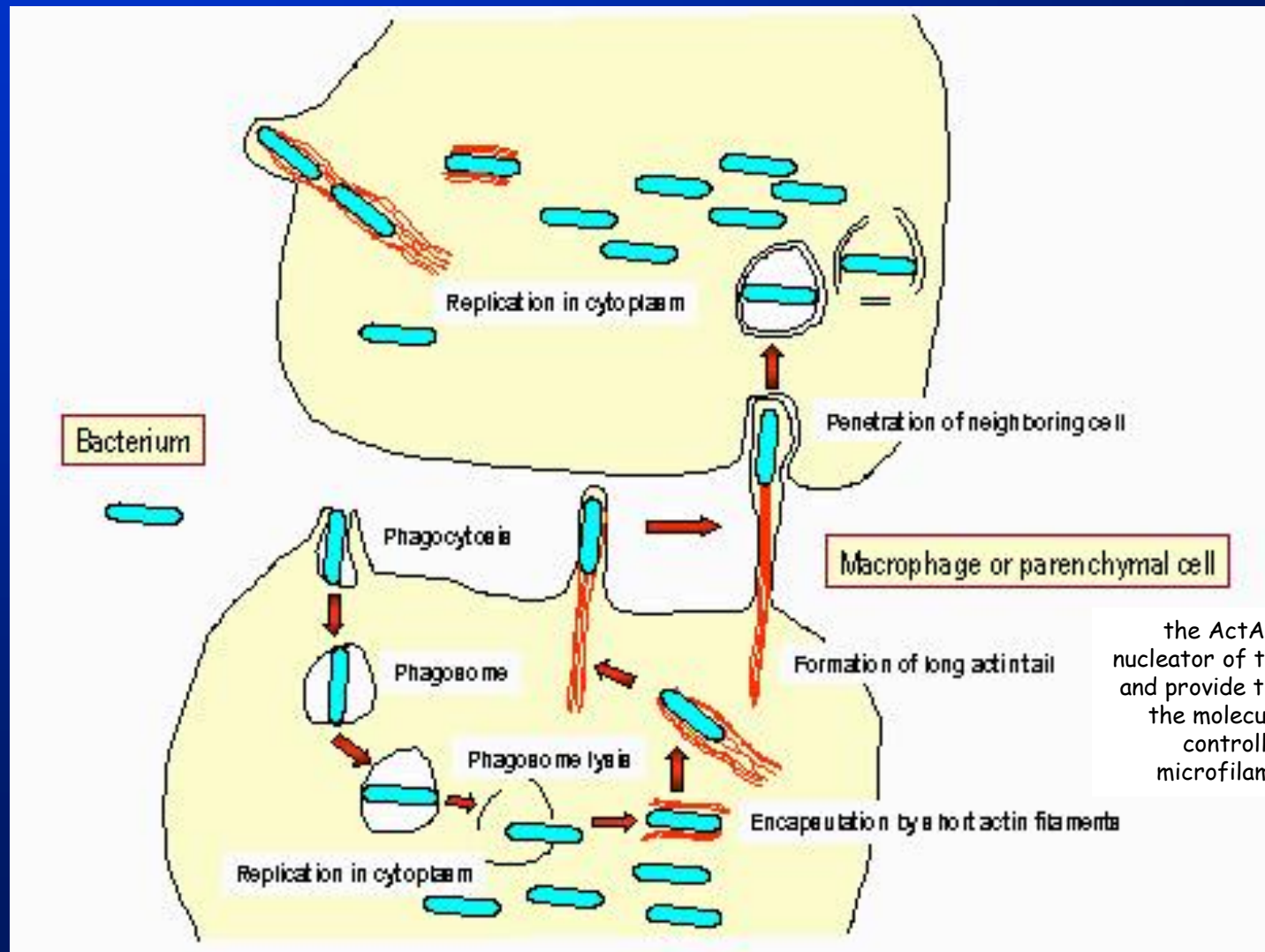
Inoltre, sottoposto a stress acidi subletali (pH 5.0 per 1 ora) acquista acido-tolleranza grazie ad uno specifico locus genetico *lisRK*

Ciclo della *L. monocytogenes* nelle cellule ospiti

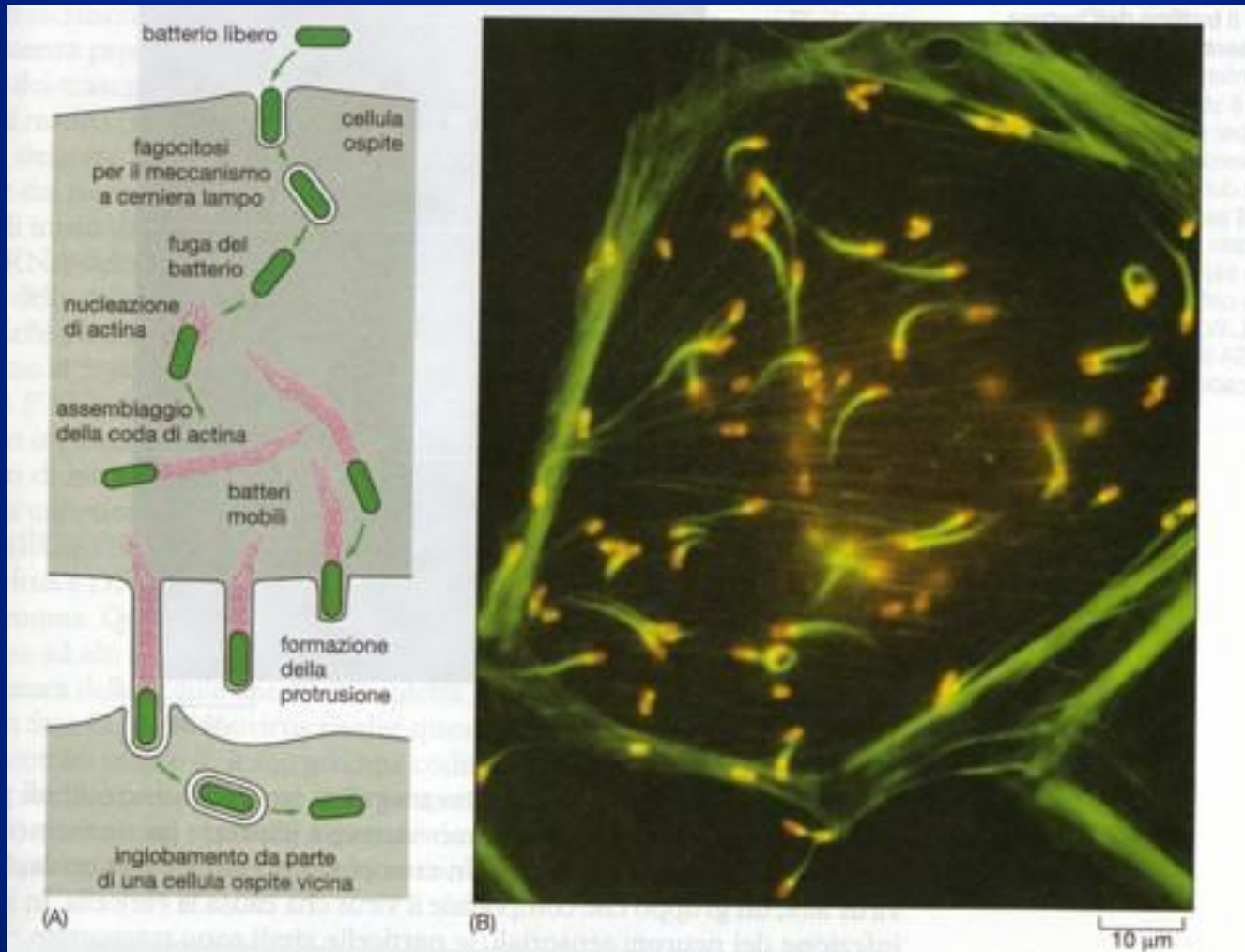
La biologia cellulare dell'infezione viene suddivisa in 4 stadi:

- 1. Internalizzazione:** adesione alle cellule mediata da residui di α D-galattosio, lectine, E-caderine, alla mucosa intestinale. Successivamente induzione del processo di endocitosi mediato da proteine di *L.m* denominate **INTERNALINE (Inl)** (penetrazione nell'enterocita)
- 2. Sopravvivenza intracellulare e uscita dal fagosoma:** una parte delle *L.m* internalizzate resiste all'attività idrolitica all'interno del vacuolo/fagosoma grazie all'azione della **EMOLISINA (LISTERIOLISINA O)** e fuoriescono dal vacuolo/fagosoma, con l'intervento della stessa **LISTERIOLISINA (LLO)** e della **FOSFOLIPASI B (PlcB)**
 La Listeriolisina è strutturalmente correlata con la Streptolisina O
- 3. Nucleazione di filamenti actinici:** grazie a specifiche attività enzimatiche (**actA protein**, complesso **Arp2/3**) avviene la polimerizzazione di filamenti actinici ad uno dei poli, formandosi così protrusioni citoplasmatiche pseudopodali della cellula ospite (**LISTERIOPODI**) che mediano l'adesione alle cellule vicine.
- 4. Diffusione intercellulare:** passaggio del germe in altre cellule grazie alle protrusioni listeriopodali, con riproduzione del ciclo di *Listeria*

Ciclo della *L. monocytogenes* nelle cellule ospiti



Il movimento basato sulla polimerizzazione di actina di *Listeria monocytogenes* all'interno di una cellula e tra una cellula e l'altra.
Da Alberts, Biologia molecolare della cellula
In rosso *Listeria*, in verde i filamenti di actina



QUADRO CLINICO

- La **LISTERIOSI** si presenta prevalentemente come evento sporadico ed è considerata generalmente una malattia poco contagiosa; si sono verificati, comunque, sia tra gli animali sia tra gli esseri umani, episodi a seguito dell'esposizione ad una stessa fonte di contaminazione.
- **MID (Dose Minima Infettiva)**: $<10^3$ ufc/g per soggetti a rischio; $>10^6$ ufc/g per soggetti normali
- **Periodo incubazione**: 1-90 giorni (2-4 settimane)
- **La malattia sistemica** è caratterizzata da 3 tipi di manifestazioni cliniche (precedute da sintomi intestinali, diarrea e crampi addominali):
 - □ Infezione in gravidanza
 - □ Granulomatosi settica del neonato
 - □ Meningoencefalite

 **Sindrome gastroenterica febbrile**, a carico di individui sani (incubazione 20-30 h)

MODALITA' DI TRASMISSIONE

- Consumo di alimenti contaminati
- Trasmissione verticale madre-feto
(rara)
- Infezione crociata nelle sale-parto o nidi (rara)
- Infezione trasmessa da uomo a uomo (rara)
- Contatto con l'animale infetto (categorie professionali)



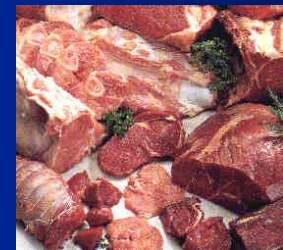
PREVENZIONE

E' estremamente importante osservare scrupolose norme igieniche, soprattutto per gravide, puerpere e neonati:

- cucinare scrupolosamente l'alimento grezzo dalle fonti animali (quali manzo, maiale o pollame);
- lavare bene le verdure prima del consumo;
- tenere le carni crude separate da verdure e da altri alimenti cucinati o pronti da mangiare;
- evitare latte e alimenti non pastorizzati e/o ottenuti da latte non pastorizzato;
- lavare mani, lame e attrezzi da taglio dopo il maneggiamento degli alimenti crudi.



PREVENZIONE



In particolare, per le persone ad alto rischio, è buona norma:

- non mangiare carni poco cotte, a meno che non siano riscaldate fino a cuocere a vapore caldo;
- non mangiare formaggi a pasta molle, quali i formaggi brie, i formaggi venati di blu e i formaggi di stile messicano. Possono essere mangiati i formaggi duri, quelli semidolci quale la mozzarella, i formaggi fusi pastorizzati e la ricotta;
- non mangiare paté, frutti di mare

Fattori di controllo della contaminazione e della moltiplicazione

- □ **Inattivazione mediante calore** (pastorizzazione.)
- □ **Inattivazione mediante disinfettanti** (composti contenenti cloro, iodofori, composti di ammonio quaternario, acidi disinfettanti)
- □ **Controllo mediante additivi alimentari** (conservanti, antiossidanti, emulsionanti, agenti acidificanti, gas di imballaggio)
- □ **Attività di starter microbici** (batteriocine, lantibiotici)
- □ **Controllo mediante la combinazione di più fattori** (pH, temperatura, conservanti e condizioni di conservazione)

**Isolamento di *L. monocytogenes* da alimenti crudi
destinati ad essere consumati previa cottura**
Ricerca di *L. monocytogenes* in carni macinate
TECNICA MPN (Most Probable Number)

- Si prelevano 5 unità campionarie (controllo ufficiale)
- 10 g di alimento (di ciascun c.u.) vengono addizionati a 90 ml di buffer peptone water sterile e omogeneizzati in stomaker per 2-3 min (diluizione madre: 10^{-1})
- Allestire diluizioni scalari: $10^{-2}/10^{-3}$
- Seminare in triplo 1 ml delle diluizioni in 9 ml di Fraser Broth + supplemento (terreno di arricchimento)
- Incubare a $32 - 35^{\circ}\text{C}$ per 24-48 ore
- 0,1 ml di ciascuna brodocoltura positiva (annerimento del terreno) viene insemato in superficie su piastre di **Palcam Agar Base + supplemento**
- Le colonie sospette (circa 2 mm di diametro, colore grigio/verdastro con centro infossato, circondate da un alone nero) vengono sottoposte alle prove di screening

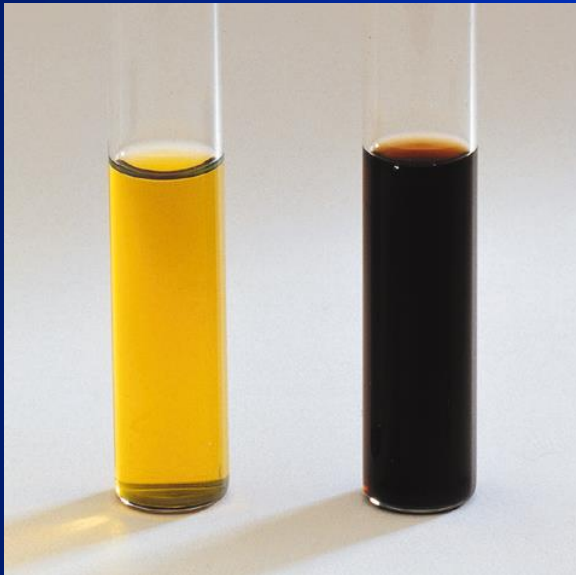
Terreni di coltura per l'isolamento di *Listeria*

- **Listeria Fraser Broth:** brodo di arricchimento selettivo contenente esculina e cloruro di litio **Supplemento:** contiene citrato ferrico di ammonio e acido nalidixico.

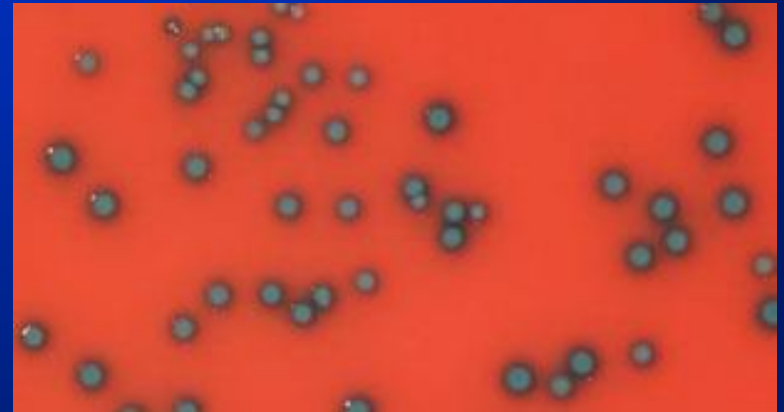
La *Listeria* idrolizza l'esculina ad esculetina che, reagendo con gli ioni ferrici, causa l'annerimento del brodo. La presenza del cloruro di litio e di acido nalidixico inibiscono la crescita degli enterococchi che, come *Listeria*, idrolizzano l'esculina.

- **Palcam Agar Base:** terreno selettivo per la presenza del cloruro di litio **Supplemento:** selettivo, perché costituito da ceftazidime, polimixina B e acriflavina. Presenta un doppio sistema indicatore:
 - Esculina e ferro ferroso (*L. monocytogenes* idrolizza l'esculina, producendo colonie con un alone nero)
 - Mannitolo e rosso fenolo (*L. monocytogenes* non fermenta il mannitolo; enterococchi e stafilococchi fermentano il mannitolo, determinando un viraggio dell'indicatore di pH dal rosso al giallo).

Listeria Fraser broth



Colonie di *L. monocytogenes* su Palcam

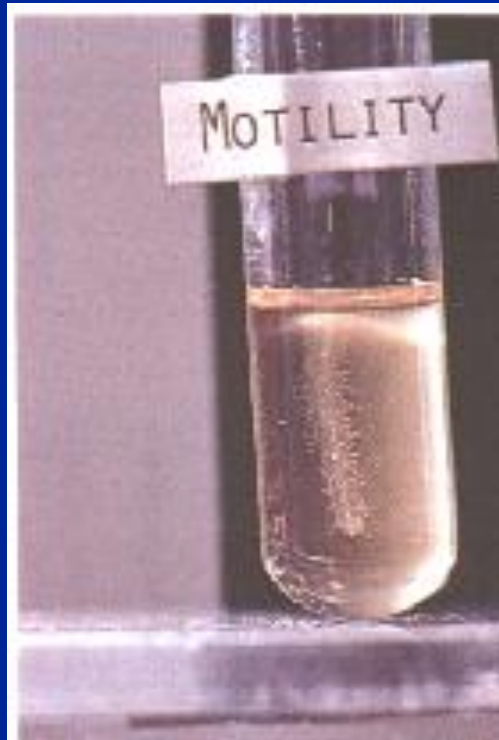


Prove di screening per *L. monocytogenes*

- Colorazione di Gram: bacillo molto piccolo, Gram +
- Test di mobilità in terreno SIM: a 22-25°C evidenzia una mobilità ad ombrello
- Catalasi: la maggior parte dei ceppi sono fortemente positivi, tuttavia alcuni possono dare una debole reazione
- beta-emolisi stretta: su Columbia Blood Agar Base (terreno arricchito) +5% di sangue di montone defibrinato, *L. monocytogenes* produce una piccola zona di emolisi (1-2 mm di diametro). Le *Listerie* appartenenti ad altre specie producono un alone di diametro differente.

Se tali prove sono positive, si procede con l'identificazione mediante il micrometodo "API Listeria"

L. monocytogenes motility



La caratteristica mobilità si nota con la crescita ad ombrello quando seminato su agar molle, cioè lungo la linea retta di infissione e verso l'alto del terreno inoculato si apre come un ombrello cioè *Listeria* tende a muoversi più vicina alla superficie del terreno

Here is a great picture of the classic umbrella motility present with *L. monocytogenes* compared with a negative control

Il CAMP Test per l'identificazione di *Listeria*

Su una piastra di agar sangue, si procede eseguendo lo striscio di *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) beta-emolitico e poi si eseguono perpendicolarmente gli strisci dei ceppi in esame.

Dopo 24-48 ore di incubazione a 35°C, si esaminano le piastre alla ricerca di reazioni emolitiche nelle vicinanze degli strisci principali.

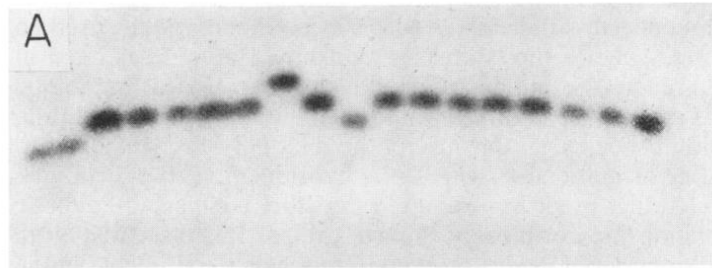
La reazione emolitica di *Listeria monocytogenes* è maggiore nelle vicinanze dello striscio di *Staphylococcus*. (test positivo)



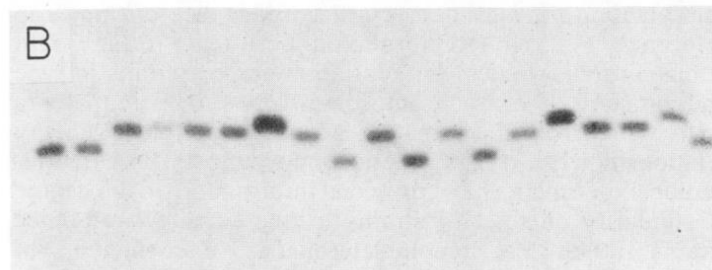
Altre tecniche...

- □ **Multilocus Enzymes Electrophoresis (MEE):** mediante la quale si possono tipizzare gli isoenzimi per definire differenti tipi elettroforetici (ET)
- □ **Multilocus Sequence Typing:** The MLST scheme used to characterize *Listeria* strains is based on the sequence analysis of the following seven housekeeping genes: *acbZ* (ABC transporter), *bglA* (beta-glucosidase), *cat* (catalase), *dapE* (Succinyl diaminopimelate desuccinylase), *dat* (D-amino acid aminotransferase), *ldh* (lactate deshydrogenase), and *lhkA* (histidine kinase).
- □ **Analisi diretta del genoma:**
 - **Restriction Enzyme Analysis (REA)**
 - **Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

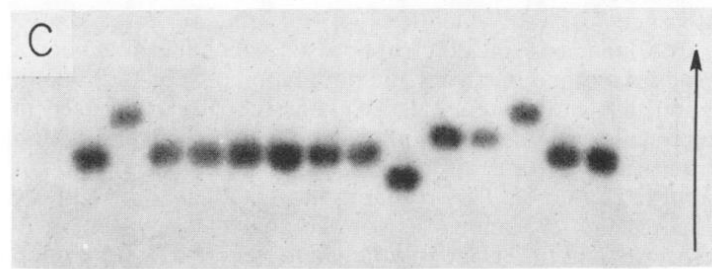
Multilocus Enzymes Electrophoresis (MEE)



Mannitolo-1P deidrogenasi



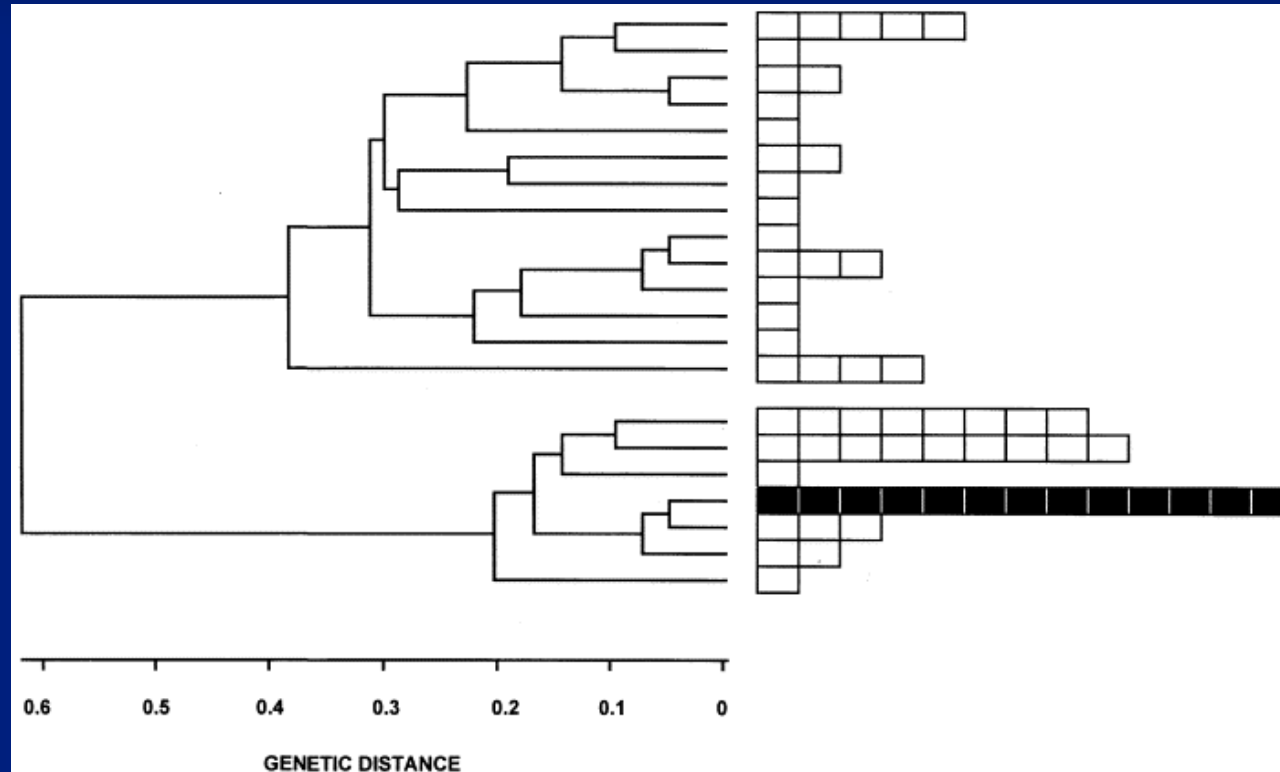
Glucosio-6P deidrogenasi



Malato deidrogenasi

FIG. 1. Gels illustrating electrophoretic variation in three en-

Utilità del saggio MLEE



Dendrogram representing the genetic relationships evidenced by MEE between 62 *Listeria monocytogenes* isolates from sporadic human clinical cases of listeriosis registered. Each box represents a clinical case, and the black boxes represent cases related to the epidemic-associated electrophoretic type 1 (ET1) described in the text. The dendrogram was generated by the average-linkage method of clustering from a matrix of pairwise coefficients of genetic distance based on the analysis of 21 enzyme loci.