

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

VI Workshop Nazionale Enter-net Italia
Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche

**Le tossinfezioni alimentari:
sorveglianza e controllo**

Roma, 17-18 maggio 2007

RIASSUNTI

A cura di

Stefano Bilei (a), Alfredo Caprioli (b),
Susanna Lana (c), Ida Luzzi (d) e Antonia Ricci (e)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

*(b) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(d) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
07/C1

Istituto Superiore di Sanità

VI Workshop Nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche. Le tossinfezioni alimentari: sorveglianza e controllo. Roma, 17-18 maggio 2007. Riassunti.

A cura di Stefano Bilei, Alfredo Caprioli, Susanna Lana, Ida Luzzi e Antonia Ricci
2007, v, 86 p. ISTISAN Congressi 07/C1

Enter-net è una rete europea per la sorveglianza delle infezioni enteriche che effettua il monitoraggio delle infezioni da *Salmonella*, *E. coli* O157 e *Campylobacter*. Finanziata dalla Commissione Europea, la rete ha i seguenti obiettivi: armonizzare i metodi di tipizzazione, mantenere database aggiornati, identificare e controllare gli episodi epidemici a carattere transnazionale, sorvegliare il fenomeno della antibiotico resistenza. L'Italia è rappresentata nel progetto dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che coordina un sistema di sorveglianza nazionale (Enter-net Italia) costituito da laboratori del Servizio Sanitario Nazionale operanti nei settori umano, veterinario e ambientale. A partire dal 2001, le attività di Enter-net Italia vengono presentate nel corso di un workshop diretto a biologi, medici, veterinari e tecnici di laboratorio del SSN. Il Workshop 2007 ha la veste di un convegno sulla sorveglianza e controllo delle tossinfezioni alimentari. Gli obiettivi sono: i) presentare le attività di Enter-net Italia; ii) analizzare e discutere i sistemi di allerta e le strategie di controllo delle tossinfezioni alimentari; iii) fornire un aggiornamento sulle nuove acquisizioni in tema di epidemiologia, eziopatogenesi e diagnostica di laboratorio delle infezioni trasmesse da alimenti.

Parole chiave: Infezioni trasmesse da alimenti, Sorveglianza

Istituto Superiore di Sanità

VI National Workshop Enter-net Italia. Surveillance system of enteric infections. Foodborne infections: surveillance and control. Rome, May 17-18, 2007. Abstract Book.

Edited by Stefano Bilei, Alfredo Caprioli, Susanna Lana, Ida Luzzi and Antonia Ricci
2007, v, 86 p. ISTISAN Congressi 07/C1 (in Italian)

Enter-net is an international network for the surveillance of human infections with *Salmonella*, *E. coli* O157 and *Campylobacter*, including their antimicrobial resistance. It is funded by the European Commission and its main objectives are the harmonisation of typing methods, the establishment of a regularly updated international database, the recognition and investigation of outbreaks involving different countries. The Istituto Superiore di Sanità (ISS) represents Italy in the network and coordinates a national surveillance system (Enter-net Italia) that involves laboratories operating in the medical, veterinary and environmental fields. Starting from 2001, Enter-net Italia activities are presented in an annual workshop with the participation of physicians, biologists, veterinarians and technicians operating in the public health services. This year the workshop is structured as a meeting that, beside presenting Enter-net activities, will provide an update on the pathogenesis, diagnosis and epidemiology of foodborne infections.

Key words: Foodborne infections, Surveillance

Responsabili scientifici: Ida Luzzi e Alfredo Caprioli

Per informazioni su questo documento scrivere a: ida.luzzi@iss.it, alfredo.caprioli@iss.it

Il Rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2007 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	v
Relazioni.....	1
Comunicazioni orali e poster	17
Indice degli autori.....	83

PROGRAMMA

Giovedì 17 maggio 2007

- 13.00 Registrazione dei partecipanti
- 14.00 Indirizzo di benvenuto
- 14.20 *Sorveglianza delle tossinfezioni alimentari: evoluzione dei sistemi di notifica*
Marta Luisa Ciofi degli Atti
- 14.40 *Enter-net: sorveglianza delle infezioni da patogeni enterici: risultati dell'attività 2005-2006*
Ida Luzzi
- 15.00 *Le Salmonellosi in ambito veterinario: risultati dell'attività 2005-2006*
Antonia Ricci
- 15.20 *Isolamenti di Salmonella sp da fonti ambientali: dati 2005-2006*
Giuseppe Cirillo
- 15.40 Confronto e dibattito
- 16.00 Intervallo
- 16.30 *Protocolli di intervento sulle tossinfezioni alimentari: esperienze regionali*
Emanuela Balocchini
- 16.50 Confronto e dibattito
- 17.10 Comunicazioni libere
- 18.00 Chiusura dei lavori

Venerdì 18 maggio 2007

- 9.00 *Il sistema d'allerta europeo: early warning*
Maria Grazia Pompa
- 9.20 *I sistemi di allerta nell'ambito della sicurezza alimentare*
Paola Picotto

- 9.40 *Fonti non ufficiali: Epidemic Intelligence*
Marco Baldari
- 10.00 Intervallo e visione poster
- 10.30 *The reporting and monitoring of zoonoses and foodborne outbreaks in the EU*
Pia Makela
- 10.50 Comunicazioni libere
- 13.00 Intervallo e visione poster
- 14.30 *I criteri microbiologici: nuovi scenari nel controllo degli alimenti*
Stefano Bilei
- 14.50 Comunicazioni libere
- 16.00 Confronto e dibattito
- 16.30 Chiusura dei lavori

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente lavoro raccoglie tutti gli abstract delle relazioni e dei contributi presentati al workshop.

I lavori sono divisi in due sezioni:

- *Relazioni*

Contiene gli abstract secondo l'ordine previsto dal programma.

- *Comunicazioni orali e poster*

I riassunti sono presentati in ordine alfabetico del primo autore: i poster sono contrassegnati dalla lettera P.

Alla fine del volume è presente un indice degli autori di ogni singolo contributo.

RELAZIONI

SORVEGLIANZA DELLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI: EVOLUZIONE DEI SISTEMI DI NOTIFICA

Marta Luisa Ciofi degli Atti (a), Caterina Rizzo (a,b), Thomas Seyler (a,c), Pasquale Galetta (a), Susanna Lana (a), Antonino Bella (a)

(a) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Università degli Studi, Bari*

(c) *European Programme for Intervention Epidemiology Training, Stoccolma*

Le Tossinfezioni Alimentari (TA) rappresentano un importante problema di sanità pubblica in Italia e nel mondo. Secondo l'OMS, infatti, nel 1998 hanno causato nel mondo circa 2,2 milioni di casi.

Nel corso del tempo lo scenario epidemiologico delle TA ha inoltre subito profondi cambiamenti, dovuti sia all'emergenza di nuovi agenti patogeni (quali *E. coli* produttori di verotossina, e nuovi sierotipi di *Salmonella*), che alla descrizione di nuovi veicoli di trasmissione. I dati di sorveglianza sono quindi di cruciale importanza per stimare le dimensioni del problema.

In Italia, le TA rientrano nel sistema di notifica obbligatoria delle malattie infettive. Ad oggi, tale sistema prevede che le malattie notificabili siano suddivise in 5 classi. Le classi di interesse per quanto riguarda le malattie a trasmissione alimentare sono soprattutto la classe II, che include salmonellosi, epatite A, brucellosi, tularemia e listeriosi, e la classe IV, dedicata alla notifica di focolai epidemici.

I dati del sistema di notifica delle malattie infettive mostrano che in Italia sono stati segnalati nel 2005 circa 230 focolai di TA. Ogni focolaio ha coinvolto in media 5,6 pazienti (range 2-120), per un totale di circa 1.300 casi. L'Emilia-Romagna risulta essere la regione che segnala il maggior numero di episodi (20% del totale nazionale), seguita da Piemonte (15%), Provincia Autonoma di Bolzano (14%), Lazio (10%), e da tutte le altre regioni.

I microrganismi che hanno causato questi focolai sono stati soprattutto *Salmonelle* spp. (52%), seguite dal virus dell'Epatite A (10%). Purtroppo il 26% delle segnalazioni dei focolai epidemici non presenta indicazione sulla eziologia degli episodi.

Oltre ai casi associati ai focolai epidemici, le infezioni da *Salmonella* rappresentano la principale causa di TA. Infatti, nel 2005 sono stati segnalati oltre 6000 casi (dati provvisori, fonte: Ministero della Salute), provenienti per la maggior parte dalle regioni del nord (60% nord, 21% centro, 19% sud Italia).

I dati relativi alle notifiche obbligatorie hanno il vantaggio di riferirsi ad un lungo periodo di tempo, con la disponibilità di lunghe serie storiche, e di essere riferiti all'intera popolazione nazionale. Tuttavia, questi dati sono spesso poco accurati e tempestivi, e sono state affiancate nel tempo da sistemi di sorveglianza speciali. Tra questi, è particolarmente importante per le TA la rete Enter-net, coordinata dall'ISS e, per quanto riguarda la componente veterinaria, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Enter-net sorveglia le infezioni da *Salmonella*, da *Escherichia coli* O157 e altri *E. coli* produttori di vero-citotossina (VTEC) e le infezioni sostenute da altri batteri enteropatogeni; inoltre monitora l'antibioticoresistenza in queste specie batteriche.

Nel 2005 sono stati segnalati ad Enter-net 4.403 ceppi di *Salmonella* isolati dall'uomo, e nel 2006 2.638. Per il 2006, tuttavia, mancano i dati del Veneto, che nel 2005 aveva riportato circa 600 isolati. Anche per quanto riguarda Enter-net, il maggior numero di segnalazioni proviene dalle regioni del nord (67% nord, 21% centro, 12% sud Italia). Emerge inoltre che per alcune regioni, il numero di casi segnalati al sistema Enter-net, che non è un sistema esaustivo, è superiore a quello riportato al sistema di notifica obbligatorio. Questi dati depongono per una forte sottostima della dimensione del fenomeno, soprattutto nelle regioni del sud Italia.

Tali osservazioni impongono pertanto di attuare in tempi rapidi azioni mirate al miglioramento della sorveglianza e dell'indagine dei focolai epidemici, in modo da potere intraprendere le appropriate azioni di controllo.

ENTER-NET: SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA PATOGENI ENTERICI: RISULTATI DELL'ATTIVITÀ 2005-2006

Ida Luzzi (a), Pasquale Galetta (b), Anna Maria Dionisi (a), Emma Filetici (a), Ildo Benedetti (a), Sergio Arena (a), Slawomir Owczarek (a), Susanna Lana (b), Antonino Bella (b), Gaia Scavia (c), Caterina Rizzo (b), Thomas Seyler (b), Fabio Minelli (c), Maria Luisa Marziano (c), Caterina Graziani (c), Marta Luisa Ciofi degli Atti (b), Alfredo Caprioli (c)

(a) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Enter-net Italia è la sezione nazionale della rete europea di sorveglianza per gli enterobatteri patogeni. Il sistema, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), raccoglie i dati relativi agli isolamenti di *Salmonella* spp., *E. coli* verotossina produttori e *Campylobacter* spp. da fonti diverse. I ceppi di *Salmonella* e *Campylobacter* vengono inviati ai laboratori regionali di riferimento che eseguono la tipizzazione biochimica e sierologica e i saggi di sensibilità agli antibiotici ed inviano all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) i dati raccolti e una selezione di ceppi per una ulteriore subtipizzazione. L'ISS inoltre sottopone alle indagini diagnostiche anche ceppi di *E. coli* inviati dai laboratori di microbiologia clinica e isolati da pazienti con sospette infezioni da VTEC. Come negli anni precedenti, anche nel 2005-06 si conferma che circa il 75% delle infezioni sono causate dai sierotipi *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Anche la prevalenza dei tipi fagici all'interno di questi sierotipi si mantiene relativamente costante ma si conferma l'aumento di ceppi di *S. typhimurium* non tipizzabile e con profilo di antibiotico resistenza ASSuT. Il numero di *Salmonelle* appartenenti al cosiddetto "nuovo sierotipo" con formula antigenica 4,5,12;i;- rimane stabile rispetto all'anno precedente, raggiungendo una frequenza di isolamento del 3%.

Come per gli anni precedenti, il maggior numero di isolamenti di *S. Napoli* si è avuto in Lombardia durante i mesi estivi. *S. Infantis* e *S. Derby* sono state isolate con frequenze simili all'anno precedente mentre altri sierotipi come *S. Give* e *Muenchen* sono entrate nella lista dei primi dieci sierotipi al posto di *S. Hadar*, e *S. Thompson* che nel corso del 2005-06 sono stati isolati più raramente. Il numero di isolamenti di VTEC non ha subito variazioni di rilievo nel corso degli ultimi anni e soprattutto si conferma la bassa incidenza di SEU nel nostro paese.

Per quanto riguarda gli isolamenti di *Campylobacter* si è potuto osservare un aumento delle segnalazioni a Enter-net e delle tipizzazioni a livello di specie che consente di cominciare a tracciare un profilo epidemiologico delle infezioni sostenute da questo patogeno in Italia, per cui non sono disponibili dati di notifica.

Nel complesso, i risultati dell'attività di sorveglianza confermano che il sistema Enter-net è in grado di fornire dati microbiologici ed epidemiologici utilizzabili per studiare l'epidemiologia delle infezioni da *Salmonella* e di altri patogeni enterici in Italia.

LE SALMONELLOSI IN AMBITO VETERINARIO: RISULTATI DELL'ATTIVITÀ 2005-2006

Antonia Ricci (a), Veronica Cibirin (a), Marzia Mancin (b), Lucia Decastelli (c), Silvia Tagliabue (d), Stefania Scuota (e), Monica Staffolani (e), Stefano Bilei (f), Elisabetta Di Giannatale (g), Maria Rosaria Carullo (h), Elisa Goffredo (i), Chiara Piraino (l), Antonio Vidili (m)

(a) Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, Legnaro, Padova

(b) Centro Regionale di Epidemiologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Macerata

(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

(g) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

(h) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

(i) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

(l) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

(m) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

Durante l'anno 2005 la rete Enter-vet, che raccoglie i dati relativamente agli isolamenti di *Salmonella* da campioni di origine veterinaria effettuati presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, ha ricevuto informazioni relativamente a 4.784 ceppi. Di questi 1.750 (36,6%) derivavano da alimenti, 2.048 (42,8%) da animali, 551 (11,5%) da campioni di origine ambientale e 403 (8,4%) da campioni di origine non nota.

Il sierotipo più frequentemente isolato è stato *S. typhimurium* (17,6%), seguito da *S. Livingstone* (9%), *Derby* (8,6%), *Enteritidis* (6,24%) e dal sierotipo monofasico 4,5:i:- (5,4%).

Fra le specie animali maggiormente rappresentate nel database Enter-vet, nel pollo il sierotipo più frequente è risultato *S. Livingstone* (25%), seguito da *Enteritidis* (13,69%), *Virchow* (8,7%), *Typhimurium* (5,51%) e *Hadar* (5%). Nel tacchino i sierotipi più frequenti sono stati *S. Heidelberg* (37,6%) e *S. Blockley* (20,6%), mentre nel suino il 26% degli isolati apparteneva a *S. typhimurium*, seguita da *Derby* (23,3%) e dal sierotipo monofasico 4,5:i:-.

Per quanto riguarda i risultati della tipizzazione fagica degli isolati di *S. typhimurium*, il fagotipo più frequentemente identificato nel 2005 è stato DT 104; la percentuale di isolamenti è aumentata rispetto al 2004 nel pollo (10,6% contro 5,4%) e diminuita nel bovino e nel suino (38,3% contro 56,7% nel bovino e 10% contro 15,8% nel suino).

Da evidenziare inoltre i fagotipi U302 e DT 208, isolati con maggiore frequenza nel suino e il DT 1 nelle ovaiole. È diminuita sensibilmente rispetto al 2004 la frequenza di isolamento del fagotipo DT 120 da suino. Come negli anni precedenti risulta elevata la frequenza di isolamento di ceppi non fagotipizzabili (NT) e RDNC (lettura stabile non identificata) soprattutto di origine suina.

Per quanto invece riguarda *S. enteritidis*, rispetto al 2004 si è verificato un notevole decremento del fagotipo PT 14b (10% contro 24,5%), ed un significativo aumento di PT 4 (26,4% contro 15,7%) e PT 1 (23,2% contro 10,2%).

Infine, dai dati relativi all'analisi dell'antibioticoresistenza emerge un'elevata percentuale di ceppi resistenti ad ampicillina (27,9%), cloramfenicolo (8,9%, con trend in diminuzione rispetto agli anni precedenti), streptomina (36,7%), sulfonamidi (33,2%), tetraciclina (45,7%) e acido nalidixico (23,9%). Lo 0,62% degli isolati è risultato resistente al ceftazidime. È interessante infine notare come, rispetto al 2004, si sia evidenziata una netta diminuzione dei ceppi multiresistenti, cioè caratterizzati da resistenza ad almeno 4 delle 16 molecole che compongono il pannello utilizzato dalla rete Enter-vet.

Per quanto riguarda più in generale la sorveglianza delle salmonellosi nel settore veterinario, nel 2005 è terminato il piano di monitoraggio nelle galline ovaiole (Decisione 2004/665/CE), che ha riguardato tutti i paesi dell'Unione Europea. In Italia, nell'ambito di questo piano è stata evidenziata una prevalenza di *Salmonella* spp. pari al 29,7%, con una prevalenza di *S. typhimurium* del 3,7% e di *S. enteritidis* del 3,9%; questi dati pongono il nostro paese al di sotto della media europea. In considerazione del fatto che la prevalenza in Italia, relativamente a *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, è inferiore al 10%, l'obiettivo di riduzione che dovrà essere raggiunto sarà pari al 10% ogni anno, per tre anni, secondo quanto stabilito dal Regolamento 1168/2006. Il piano nazionale di controllo di *S. typhimurium* e *S. enteritidis* nelle galline ovaiole avrà inizio il 1° gennaio 2008, e dovrà quindi portare entro la fine del 2010 ad una riduzione della prevalenza del 2,5% (cioè al di sotto del 6%).

Il materiale relativo all'attività della rete Enter-vet e ai piani di monitoraggio e controllo è disponibile presso il sito del Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi (www.izsvenezie.it; cliccando su "centri di referenza", "salmonellosi", "attività").

ISOLAMENTI DI *SALMONELLA* SP. DA FONTI AMBIENTALI: DATI 2005-2006

Giuseppe Cirillo (a), Marta Bacchi (a), Daniela Caroli (b), Pasquale Galetta (c), Annamaria Manuppella (d), Marina Molina (e), Francesco Ortali (a), Monica Staffolani (f), Alberta Stenico (g)

(a) Agenzia Regionale Protezione Ambiente Emilia-Romagna, Forlì

(b) Agenzia Regionale Protezione Ambiente Piemonte, Grugliasco

(c) Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(d) Agenzia Regionale Protezione Ambiente Molise, Isernia

(e) Agenzia Regionale Protezione Ambiente Liguria, Genova

(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Macerata

(g) Agenzia Provinciale Protezione Ambiente, Bolzano

La normativa vigente prevede la ricerca del genere *Salmonella* anche in matrici ambientali come acque di scarico, acque superficiali, laghi, mare, liquami e fanghi che vengono a vario titolo periodicamente monitorati (L 748 del 19.10.84, DL 99 del 27.01.92, DL 152 del 03.04.2006, D 185 del 12.06.2003 e DL 31 del 02.02.2001). Nelle matrici ambientali si assiste a una marcata eterogeneità di specie a differenza di quanto accade nell'uomo e negli animali. In tal modo nelle acque superficiali si viene a creare l'habitat ideale in cui prolifera un *pool* di specie di cui solo alcune compiono il ciclo completo passando agli animali e poi eventualmente all'uomo.

Nell'ambito del progetto Enter-net, la ricerca di *Salmonella* sp nell'ambiente è generalmente effettuata dalle Agenzie Regionali di Prevenzione Ambientale, ma non tutte le regioni svolgono questo tipo di attività analitiche anche a causa delle differenti competenze che le Agenzie hanno assunto nelle diverse regioni. Nonostante questo si è riusciti a costituire Centri di Riferimento Regionali in Piemonte, Liguria, Provincia Autonoma di Bolzano, Emilia-Romagna, Molise, Lazio. Questi Centri sono operativi da tempo e offrono il loro servizio trasversale non solo per i Laboratori di Microbiologia Ambientale, ma anche, in alcuni casi, come service di Laboratori Ospedalieri e di servizi Veterinari limitatamente agli alimenti, farmaci e cosmetici di origine vegetale.

Nel biennio 2005/2006 sono stati isolati e tipizzati 4.076 ceppi di cui 2.942 da matrice ambientale, 86 da matrice alimentare, 978 da matrice umana e 70 controlli di qualità.

Gli isolamenti per Regione sono stati: Emilia-Romagna 2.793, Veneto 61, Piemonte 334, Molise 314, Lombardia 188, Liguria 184, Bolzano/Trento 166, Friuli VG 20, Marche 122, Puglia 5.

Dei 2.942 ceppi ambientali, circa l'83% proviene da acque superficiali (fiumi, laghi, mare, acque reflue), il 10% da fanghi di depurazione e il 6% da altre fonti (*indoor*, ecc).

Si può notare l'alta variabilità di specie che si verifica negli isolamenti da matrici ambientali con 143 specie diverse anche se il maggior tasso d'isolamenti si verifica nei Gruppi B/C/D/E/F.

I primi dieci sierotipi isolati da matrici ambientali sono *S. typhimurium* 459(15,6%), *Veneziana* 405(13,7%), *Infantis* 166(5,6%), *Derby* 162(5,5%), *Bredeney* 135(4,5%), *London* 115(3,9%), *Montevideo* 91(3,0%), *Agona* 89(3,0%), *Enteritidis* 81(2,7%),

Livingstone 80(2,7%). Circa 1.159 isolamenti pari al 39,3% sono rappresentati da altri sierotipi. I primi dieci sierotipi detengono il 60,7% del totale degli isolamenti a differenza dei primi dieci isolamenti umani che detengono da soli l'89,3%.

S. Veneziana, dopo *S. typhimurium*, è ancora la specie di maggior isolamento nell'ambiente, ma, per ora non trova quasi mai riscontro nell'uomo e negli alimenti. Esiste una convergenza nei primi dieci sierotipi di 6/10 fra umani e ambientali.

S. enteritidis, isolata dal 19,4% delle infezioni umane, rappresenta solo il 2,7% degli isolamenti ambientali. A differenza degli stipiti umani, nell'ambito dei quali i due sierotipi più frequenti (*S. typhimurium* e *S. enteritidis*) rappresentano circa il 71,4% degli isolamenti totali, i due sierotipi più diffusi tra gli isolati ambientali (*S. typhimurium* e *S. Veneziana*) sono solo il 29,3% del totale.

La conoscenza di quanto accade anche nelle matrici ambientali, che sono poi strettamente correlate alle attività umane, serve a completare lo studio del movimento profondo di *Salmonella* sp. La variabilità di sierotipi ambientali testimonia la presenza di questo microorganismo in serbatoi naturali non costituiti soltanto da insediamenti agro-alimentari, ma anche da specie selvatiche. È indubbio che solo alcuni sierotipi parassitano uomo e animali diventando agenti di tossinfezioni. La costituzione di una rete dedicata di sorveglianza ambientale potrebbe garantire una miglior copertura del territorio e la disponibilità di dati più accurati consentendo di valutare meglio il ruolo che l'ambiente gioca nella trasmissione dei patogeni enterici all'uomo.

PROTOCOLLI DI INTERVENTO SULLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI: ESPERIENZE REGIONALI

Emanuela Balocchini

Unità Operativa Igiene Pubblica, Direzione Generale Diritto alla Salute e Politiche di Solidarietà, Regione Toscana, Firenze

La creazione di un sistema efficace di raccolta di dati sulle malattie infettive a trasmissione alimentare registrate nella popolazione umana è essenziale affinché le informazioni prodotte svolgano un ruolo di indirizzo per la individuazione delle priorità sanitarie e la valutazione dell'efficacia dei programmi di prevenzione.

La costruzione di un sistema di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare permette di perseguire complessivamente i seguenti obiettivi:

- seguire l'evoluzione dell'incidenza delle infezioni e delle loro conseguenze (complicanze, esiti, ecc.);
- individuare e descrivere le epidemie;
- orientare le misure di prevenzione;
- monitorare e valutare i programmi di prevenzione;
- seguire i fattori di rischio (veicoli, fonti, comportamenti e abitudini alimentari, consumi, ecc.);
- sorvegliare i trattamenti (es. resistenza alle terapie);
- conoscere i microrganismi circolanti.

SISTEMA DI ALLERTA NELL'AMBITO DELLA SICUREZZA ALIMENTARE

Paola Picotto

Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, Ministero della Salute, Roma

Il regolamento CE 178/2002, del Parlamento europeo e del Consiglio, stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

Per notificare in tempo reale i rischi diretti o indiretti per la salute pubblica connessi al consumo di alimenti o mangimi è stato istituito il sistema rapido di allerta comunitario, sotto forma di rete, a cui partecipano la Commissione Europea e gli Stati membri dell'Unione.

L'Ufficio VI della Direzione Generale della sicurezza degli alimenti e della nutrizione del Ministero della Salute è il punto di contatto italiano per il sistema di allerta comunitario. Il meccanismo delle comunicazioni rapide, sempre più numerose negli ultimi anni, è uno strumento essenziale per la valutazione di eventuali rischi e per la tutela del consumatore. Al riguardo il flusso delle allerta deve garantire sia la completezza delle informazioni che la tempestività della comunicazione.

Ciò si realizza con apposite procedure operative che prevedono:

- schede di notifica standard (completezza delle informazioni);
- uso della posta elettronica (tempestività della comunicazione).

Le notifiche vengono quindi comunicate e condivise tra gli Stati membri via rete, in tempo reale. L'attività del sistema di allerta prevede il ritiro di prodotti pericolosi per la salute umana o animale.

Nel caso di rischio grave ed immediato (esempio tossina botulinica), oltre a disporre immediatamente il sequestro dei prodotti tramite l'intervento del Comando Carabinieri della Sanità e degli Assessorati Regionali, la procedura di emergenza può essere integrata con comunicati stampa. In questo caso vengono informati i cittadini sul rischio legato al consumo di un determinato prodotto e sulle modalità di riconsegna dell'alimento alla asl territorialmente competente. La Commissione Europea ha istituito sul proprio sito uno spazio apposito per la consultazione on line delle notifiche settimanali, *weekly overview of alert and information notifications*, trasmesse dai paesi della comunità.

Il sito web (http://europa.eu.int/comm/food/rapidalert/index_en.htm) consente di conoscere le notifiche settimanali divise in:

- *new alert notification* per i prodotti a rischio che sono sul mercato europeo;
- *new information notification* per i prodotti non presenti sul mercato europeo o già sottoposti a misure di controllo dal paese interessato.

Si tratta di una tabella riassuntiva, da considerare una ulteriore fonte di informazione, attraverso la quale gli enti sanitari territoriali interessati possono direttamente venire a conoscenza delle notifiche. Nel caso di necessità di approfondimento si invitano i medesimi a prendere contatto con gli uffici ministeriali centrali o periferici competenti.

FONTI NON UFFICIALI: EPIDEMIC INTELLIGENCE

Pier Luigi Lopalco (a,b), Marco Baldari (b)

(a) *Università degli Studi, Bari*

(b) *European Centre for Disease Prevention and Control, Stoccolma*

Il Centro Europeo per la Prevenzione ed il Controllo delle Malattie (ECDC) è stato avviato nel maggio 2005 ed ha sede a Stoccolma. L'ECDC è una Agenzia della Commissione Europea (EC) alla pari di EMEA, EFSA, ecc. Ha una organizzazione ed un budget indipendente e potrà contare, a pieno regime, su uno staff tecnico di 300 persone. Il principale mandato dell'ECDC è di identificare, valutare e comunicare eventuali minacce per la salute pubblica in Europa nel campo delle malattie infettive. Tale missione deve essere svolta attraverso attività di sorveglianza, ma anche intervenendo sul piano delle conoscenze scientifiche e sul grado di preparazione a livello di ogni singolo stato membro.

Per questo motivo le principali attività del Centro sono fondamentalmente distinte in attività di sorveglianza, di supporto scientifico e di *Epidemic Intelligence*.

Per *Epidemic Intelligence* (EI) si intende correntemente un processo che comprende l'identificazione, la verifica e l'analisi di eventi che possano rappresentare un pericolo per la salute pubblica. L'EI comprende pertanto attività che vanno dalla messa a punto di sistemi di allerta fino alla indagine delle epidemie. A tal fine è necessario integrare le informazioni provenienti dai tradizionali canali della sorveglianza epidemiologica - o di altri sistemi di raccolta routinaria di dati quali registri di mortalità o ricoveri ospedalieri - con altre provenienti da fonti anche informali su qualsiasi evento di rilevanza per la salute pubblica.

L'EI integra le informazioni provenienti dai tradizionali canali della sorveglianza - spesso caratterizzate da una non eccezionale tempestività - con attività basate sul vaglio di "eventi" provenienti dalle fonti più disparate, non ultime le fonti di stampa (generalmente i giornalisti si trovano sul "luogo del delitto" prima degli operatori di sanità pubblica). Le agenzie di EI devono pertanto cercare di catturare tutti questi eventi, filtrarli criticamente e verificarne la correttezza; da questa attività potrebbe scaturire dunque un "segnale" significativo per la salute pubblica. Da qui parte una seconda serie di azioni che vanno dalla valutazione del segnale (*risk assessment*), alla indagine attiva dell'evento, cui far seguire le opportune misure.

In questa cornice di attività, l'ECDC raccoglie informazioni sia strutturate nella forma classica della sorveglianza che attraverso sistemi basati sulla segnalazione di *eventi*. Nel primo gruppo possiamo annoverare i numerosi network europei che hanno ormai una tradizione pluriennale, fra cui Enter-net. Fra i sistemi alternativi, invece, al primo posto va citato l'*Early Warning and Response System*, un sistema di comunicazione fra tutti gli stati membri, l'ECDC e la Commissione Europea per scambiare in tempo reale informazioni rilevanti su problemi che possano interessare più di un singolo stato in Europa. Quindi, liste pubbliche di distribuzione quali PROMED o sistemi web specializzati quali *MediSys*, *Gideon*, *Gphin*. Da non dimenticare infine l'apporto centrale rappresentato dalla rete informale di operatori sanitari che, in tutta Europa, sono in costante contatto, pronti a scambiare notizie ed opinioni al primo segnale originatosi sul territorio che possa rappresentare un pericolo per i diversi stati dell'Unione Europea.

THE REPORTING AND MONITORING OF ZOOSES AND FOODBORNE OUTBREAKS IN THE EU

Pia Makela
European Food Safety Authority, Parma

The Community system for monitoring and collection of information on zoonoses is based on the Zoonoses Directive 2003/99/EC, which obligates the Member States to collect relevant and where applicable comparable data of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks. Member States shall transmit to the European Commission, every year, a report covering the data collected. The European Food Safety Authority (EFSA) is assigned the tasks of examining the data collected and preparing the Community Summary Report, and EFSA also in practice runs the data collection system.

Data collected under the Directive 2003/99/EC relate to the occurrence of zoonotic agents isolated from animals, food and feed as well as to antimicrobial resistance in these agents. This includes also information on foodborne outbreaks.

The information concerning zoonoses cases in humans and related antimicrobial resistance is derived from the Communicable Disease Networks referred to in Council Decision No 2119/98/EC (most importantly from the Basic Surveillance Network (BSN) and two Dedicated Surveillance Networks (DSN): Enter-Net and Euro-TB). These networks are currently coordinated by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). ECDC gathers the data from the disease networks, analyses it and submits the data to EFSA. EFSA, assisted by its Zoonoses Collaboration Centre, combines the information from humans, food, animals and feed into the annual Community Summary Report.

In 2005, twenty-five Member States and three non-Member States provided information for the Community Summary Report. This data covered 16 zoonotic diseases. The analysis of the data highlighted campylobacteriosis as the most frequently reported zoonotic disease in humans within the EU. Reported *Campylobacter* cases increased by 7.8% compared to the previous year rising to an incidence rate of 51.6 cases per 100,000 people and to a total of 197,363 recorded cases. Salmonellosis remained the second most frequent zoonosis with 176,395 reported human cases, despite the fall of 9.5% to an incidence rate of 38.2 compared to 2004.

Amongst foodstuffs, the highest proportion of *Campylobacter* positive samples was reported for fresh poultry meat, where up to 66% samples were found positive. *Campylobacter* was also commonly detected from live poultry, pigs and cattle.

Salmonella was most often reported from fresh poultry and pig meat where proportions of positive samples up to 18% were detected. In table eggs, findings of positive samples ranged from 0% to 6%, but over the past 5 years an overall decreasing trend in occurrence of *Salmonella* in eggs was observed. In animal populations, *Salmonella* was most frequently detected in poultry flocks.

Salmonella, *Campylobacter*, and viruses were the most important causes of reported foodborne outbreaks in 2005. Egg and bakery products were the most common sources of *Salmonella* outbreaks, whereas broiler meat was an important source for both *Salmonella*

and *Campylobacter* outbreaks. Foodborne virus outbreaks were most often caused by drinking water, fruit and vegetables.

Relatively high proportions of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from animals and food were resistant to antimicrobials commonly used in treatment of human diseases. This is especially the case of resistance to fluoroquinolones in *Campylobacter* isolates from poultry, where up to 94% of isolates were reported resistant to ciprofloxacin.

In 2005, a total of 9,630 human yersiniosis cases were reported. Other bacterial zoonoses - listeriosis, infections caused by verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and brucellosis - accounted for approximately 1,000-3,000 reported human cases each, whereas a total of 119 tuberculosis cases caused by *M. bovis* was registered.

Very few ready-to-eat foods contained *Listeria monocytogenes* bacteria at levels over a limit that poses a significant risk to human health. Samples exceeding this limit were most often found in fishery products. The lack of serotype and virulence factor information of the VTEC and *Yersinia* findings in food and animals prevented a proper assessment of the relevance of these findings to human disease cases.

Most of the Member States are either officially free from bovine tuberculosis and bovine or caprine/ovine brucellosis, or reported no positive cases in 2005. However, in some of the non-free Member States prevalence at the levels of 3-4% was still detected in bovine/sheep/goat populations.

The parasitic zoonoses, echinococcosis, and trichinellosis, accounted for 320 and 174 reported human disease cases respectively in 2005. *Trichinella* was rarely detected in slaughter animals. For both zoonoses, wildlife is an important reservoir of infections. There is a distinct geographical distribution of the findings of the parasites in the EU. The *Toxoplasma* parasite was reported from various animal species in 2005.

I CRITERI MICROBIOLOGICI: NUOVI SCENARI NEL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

Stefano Bilei

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Entrato ufficialmente in vigore il 1° gennaio 2006, il Regolamento CE n. 2073/2005 armonizza a livello europeo i criteri microbiologici, sino a ieri definiti autonomamente dai singoli Stati membri, applicabili alle derrate alimentari in libera circolazione all'interno del mercato unico. La norma si propone in particolare di elevare il livello di sicurezza dei prodotti alimentari e in questo modo ridurre i rischi microbiologici derivanti dal loro consumo, anche attraverso una più omogenea valutazione del loro profilo igienico sanitario e di sicurezza alimentare. Introduce importanti elementi di novità nell'ambito del controllo microbiologico degli alimenti, compresi quelli di origine vegetale. Individua alcuni criteri microbiologici considerati importanti per la protezione della salute del consumatore, basati sulla valutazione del rischio, strumento scientifico per la sicurezza alimentare e ridimensiona l'importanza che taluni parametri di scarsa o irrilevante valenza sanitaria hanno avuto fino ad oggi nelle determinazioni delle autorità sanitarie.

Per ogni criterio microbiologico inoltre, distinti nelle categorie di sicurezza alimentare e di igiene di processo, indica in modo esplicito i metodi di riferimento con cui pervenire alla loro determinazione e i limiti tollerati.

In particolare per quanto riguarda la sicurezza alimentare sono indicati i seguenti criteri *Listeria monocytogenes* per i soli prodotti RTE, *Salmonella*, *E. coli*, Enterotossine stafilococciche, *Enterobacter sakazakii* e Istamina mentre, per quelli di igiene di processo Conteggio delle colonie aerobiche, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Salmonella*.

Modificazioni dei criteri stabiliti o introduzione di nuovi criteri saranno possibili sulla base dell'evoluzione delle conoscenze nel settore della sicurezza alimentare e della microbiologia degli alimenti nonché dei risultati della valutazione del rischio.

Destinatario principale della norma, è l'Operatore del Settore Alimentare (OSA), che ha l'obbligo di assicurare l'igiene degli alimenti attraverso il rispetto dei criteri di sicurezza alimentare per il prodotto finito per l'intera durata del suo periodo di conservabilità e dei criteri di igiene relativi al processo produttivo.

Alla accertata non conformità ai criteri di sicurezza, deve corrispondere il ritiro o il richiamo del prodotto o della partita che non si trovasse più sotto il suo controllo, ai sensi dell'articolo 19 del Regolamento CE/178/2002. I prodotti già immessi sul mercato, e non ancora giunti a livello del dettaglio, potranno se del caso e previo parere favorevole del veterinario ufficiale, essere sottoposti ad una ulteriore trasformazione mediante un processo che garantisca l'eliminazione del pericolo in questione.

I criteri di igiene di processo hanno invece l'obiettivo di fornire indicazioni all'OSA circa la correttezza e l'efficacia dei processi e sulle opportune azioni correttive al fine di riportare il processo sotto il proprio controllo.

Risulta determinante a tale fine, l'adozione di un sistema di autocontrollo basato sulla metodologia HACCP che preveda un piano di campionamento per la verifica di conformità con i limiti microbiologici di processo indicati.

Al rispetto dei piani di campionamento e dei limiti previsti per le singole determinazioni analitiche dal Regolamento CE/2073/05, è tenuto anche il Servizio Veterinario nel caso intenda valutare l'accettabilità di una determinata partita di alimenti e, più in generale, durante tutti i controlli ufficiali in fase di commercializzazione, se le matrici ed i microrganismi da ricercare coincidono con quelli elencati nel Capitolo 1 dell'Allegato I (Criteri di sicurezza). Ai sensi dell'articolo 1 del Regolamento CE/2073/2005, la stessa Autorità può comunque procedere, conformemente al Regolamento CE/882/2004, senza vincoli o pregiudizi, al campionamento su matrici e parametri diversi da quelli indicati dal medesimo Regolamento.

Per quanto riguarda poi il controllo dei processi, l'Autorità valuta le procedure applicate, gli andamenti dei risultati analitici dei campionamenti effettuati dall'impresa ed ogni altro aspetto ritenuto necessario ad ottenere la massima "soddisfazione" circa le garanzie offerte dai processi stessi.

I controlli microbiologici eseguiti per la verifica della conformità ai criteri di igiene di processo, avendo caratteristica di indagine conoscitiva producono solo sollecitazioni all'operatore per l'individuazione delle cause di eventuali risultati insoddisfacenti, l'implementazione delle frequenze di campionamento, la revisione delle buone pratiche di lavorazione e l'attuazione delle azioni correttive previste nel Capitolo 2 Allegato I. Nel caso in cui l'impresa alimentare non ponga rimedio alla situazione di risultati non soddisfacenti, vengono adottati i provvedimenti prescrittivi (art. 54) e/o sanzionatori (art. 55) previsti dal Reg. CE/882/2004.

Per realizzare un approccio uniforme in materia di controllo ufficiale è previsto che gli Stati membri provvedano a stabilire ed applicare piani pluriennali conformemente ad orientamenti generali elaborati a livello comunitario. Tali orientamenti dovrebbero poi a livello nazionale, portare all'identificazione delle priorità nonché alle procedure di controllo più efficaci sulla base di criteri scientifici e statistici coerenti con la metodologia basata sull'analisi del rischio. In Italia, l'orientamento è quello di produrre un Piano generale, ovvero un documento che orienti la pubblica amministrazione, ai vari livelli, nella stesura dei vari piani di controllo sulla sicurezza degli alimenti e dei mangimi.

COMUNICAZIONI ORALI E POSTER

P1. VALUTAZIONE DI ENTER-NET ITALIA ED EVOLUZIONE DEL SISTEMA

Antonino Bella (a), Thomas Seyler (a,d), Pasquale Galetta (a), Caterina Rizzo (a,e), Ida Luzzi (b), Alfredo Caprioli (c), Gaia Scavia (c), Susanna Lana (a), Marta Luisa Ciofi degli Atti (a)

(a) *Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) *European Programme for Intervention Epidemiology Training, Stoccolma*

(e) *Università degli Studi, Bari*

Allo scopo di migliorare il sistema di sorveglianza Enter-net Italia, è stata effettuata una valutazione dei dati relativi ai ceppi di *Salmonella* isolati dall'uomo dal 1 gennaio 2000 al 28 febbraio 2007. Il database Enter-net è composto da 67 variabili, 43 delle quali sono compilate dai Laboratori periferici, 22 dai Laboratori di Riferimento Regionale e 2 dall'Istituto Superiore di Sanità. La valutazione del sistema ha considerato la sua rappresentatività geografica, la completezza delle informazioni raccolte e la tempestività della trasmissione dei dati.

Partecipano alla sorveglianza 19 Regioni e Province autonome (90% del totale nazionale). Nel periodo considerato, sono stati segnalati 34.435 ceppi di *Salmonella* da isolati umani. All'interno delle regioni e province autonome, la copertura sul territorio nazionale non è uniforme. Infatti il 12% delle province non hanno mai segnalato nessun caso durante tutto il periodo considerato. Anche le segnalazioni non sono distribuite equamente sul territorio, infatti, nel 2006, il 67% degli isolati proviene dal nord, il 21 dal centro e solo il 12% dal sud Italia.

La completezza delle informazioni raccolte è stata valutata su alcune variabili di particolare rilevanza (regione, data di nascita del paziente, motivo dell'esame, data prelievo del campione, risultato della tipizzazione del ceppo). Mediamente la percentuale di isolati per cui sono disponibili tutte le informazioni è del 42%, ma varia molto da regione a regione (range 12%-96%). Se tali variabili vengono considerate singolarmente la completezza diminuisce dal 100% per la regione, al 67% per la data di nascita.

Oltre a queste cinque variabili *core*, va segnalato che la variabile "laboratorio di origine", pur essendo quasi sempre presente, non risulta tuttavia analizzabile a causa dell'enorme difformità dei codici utilizzati. La tempestività è stata valutata sia in termini di differenza tra la data di prelievo del campione e la data di compilazione della scheda, sia considerando la proporzione di regioni che invia i dati in ISS a cadenza mensile. L'intervallo tra data del prelievo e data di compilazione è in media di 74 giorni (range 12-140 giorni). Il 60% delle regioni invia i dati con cadenza mensile.

Le criticità nell'attuale sistema risiedono principalmente nelle differenze di copertura geografica e nella tempestività del flusso dei dati. Per migliorare la sensibilità si sta

cercando di aumentare il numero di laboratori periferici afferenti alla rete e di aumentare e migliorare l'attitudine alla segnalazione per i centri già partecipanti.

Per migliorare la tempestività del flusso dei dati, l'Istituto Superiore di Sanità ha sviluppato un'applicazione Web per la raccolta on-line dei dati. Questo nuovo sistema di raccolta dei dati azzerava sia i tempi di trasmissione dei dati che quelli per l'elaborazione, rendendo le informazioni disponibili in tempo reale a livello locale e nazionale.

IL TASSO DI INCIDENZA DELLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI QUALE INDICATORE DI EFFICACIA PER IL SERVIZIO VETERINARIO DI IGIENE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Claudio Bernardi

Servizio Veterinario di Igiene degli Alimenti di Origine Animale, Azienda ULSS 7 del Veneto, Pieve di Soligo, Treviso

La *mission* di un Servizio è lo scopo per il quale esso esiste. Nel caso del Servizio Veterinario di Igiene degli Alimenti di Origine Animale, la *mission* è la tutela della salute dei cittadini, considerati quali consumatori di alimenti di origine animale. Il Servizio persegue questo obiettivo attraverso il controllo della filiera produttiva. Tra le attività di controllo, ricordiamo le ispezioni, gli audit, le verifiche ed i campionamenti.

Per verificare che i risultati del processo di controllo siano conformi agli obiettivi, si utilizzano gli indicatori. Questi, infatti, sono “ Informazioni quantitative o qualitative che consentono di valutare le modificazioni del processo nel tempo, nonché di verificare il conseguimento degli obiettivi prefissati al fine di consentire la corretta assunzione delle decisioni”.

Tra gli indicatori indispensabili per la gestione dei sistemi vi sono gli indicatori di efficacia, laddove per efficacia si intende il “Grado di realizzazione delle attività pianificate e di conseguimento dei risultati pianificati”. In estrema sintesi, Efficacia = Risultati/Obiettivi.

Nei sistemi sanitari, i risultati "veri" vanno ricercati nello stato di salute dei cittadini. In un reparto ospedaliero, ad esempio, potrà essere misurato il rapporto tra il numero dei pazienti guariti e quello dei pazienti curati.

Nel caso del Servizio Veterinario di Igiene degli Alimenti di Origine Animale, la legislazione e la letteratura (peraltro molto scarsa) riportano un solo indicatore di salute valido. In altri termini esiste un solo indicatore di efficacia.

Tale indicatore è il tasso di incidenza delle tossinfezioni alimentari.

In base alle considerazioni riportate e con lo scopo di migliorare l'efficacia dei Servizi Veterinari, l'autore propone di adottare le seguenti strategie:

- definire una scheda di rilevazione delle tossinfezioni alimentari con caratteristiche uniformi almeno in ciascuna regione;
- inserire in tale scheda richieste di informazioni riguardanti gli alimenti consumati;
- inserire i Servizi Veterinari tra i destinatari istituzionali delle informazioni epidemiologiche in materia di tossinfezioni alimentari;
- studiare e sperimentare altri indicatori che siano in grado di misurare l'efficacia del Servizio, anche in maniera indiretta.

CASE REPORT SU EVENTO EPIDEMICO DI TOSSINFEZIONE ALIMENTARE: IMPORTANZA DELLA COLLABORAZIONE TRA ISTITUZIONI

Roberto Boggi (a), Andreina Ercole (a), Ida Luzzi (b), Claudio Gnesivo (c), Mariarosaria Loffredo (c), Stefano Bilei (d), Marta Argentieri (e), Bruno Corda (a)

(a) Servizio Igiene e Sanità Pubblica, ASL RM A, Roma

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Servizio Igiene e Sanità Pubblica, ASL RM D, Roma

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

(e) UO Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma

A cavallo dei mesi di agosto e settembre 2006 sono giunti, all'attenzione della UO Epidemiologia e Profilassi Malattie Infettive dell'ASL RM A, tre eventi epidemici di tossinfezione alimentare che hanno coinvolto tre distinti gruppi di popolazione esposti al medesimo rischio alimentare (stesso ristorante e stesso alimento), anche se in tempi diversi. Tutti e tre gli eventi sono risultati riconducibili allo stesso agente patogeno, la *Salmonella enteritidis* fagotipo 2 (PT2). Anche la tipizzazione molecolare effettuata mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE) ha mostrato un'omologia genetica del 100% indicando che tutti erano riconducibili allo stesso clone batterico.

Tutti i pazienti si sono rivolti alla medesima struttura ospedaliera, cosa che ha reso più semplice l'espletamento dell'indagine epidemiologica e la raccolta degli isolati di *Salmonella enteritidis* da inviare all'ARPA, all'IZS e all'ISS per la conferma e l'ulteriore tipizzazione. I sintomi comuni a tutti e tre i casi sono stati diarrea profusa e febbre elevata (tra i 38,5 e i 40°C). Il periodo di incubazione variava da 11 a 41 ore, con una mediana di 12 ore. L'alimento sospetto, sulla base dell'elaborazione dei tassi di attacco, era una mousse al cioccolato. La data di consumo dell'alimento variava dal 5 agosto al 14 settembre. L'esercizio commerciale coinvolto è rimasto chiuso per ferie estive dal 7 agosto al 4 settembre. Le indagini epidemiologiche sono state condotte in collaborazione dal SISP della ASL RM A e da quello della ASL RM D. Il sopralluogo presso l'esercizio commerciale coinvolto è stato effettuato dal SIAN della ASL RM D, che non ha evidenziato carenze igienico-manutentive. La coprocultura per *Salmonella*, effettuata su tutto il personale, ha dato esito negativo.

Secondo le informazioni raccolte, la mousse al cioccolato veniva preparata giornalmente usando uova fresche e cioccolato in polvere. Sono stati prelevati campioni di vari alimenti, tra cui anche le uova e la mousse, tutti risultati negativi per batteri enteropatogeni. È ipotizzabile che, almeno in questa occasione, siano state preparate un certo numero di monoporzioni di mousse in qualche modo contaminate. Di queste, una parte sarebbe stata consumata e la parte restante sarebbe stata congelata per essere poi consumata dopo il periodo di chiusura estiva.

Prendendo spunto dall'esposizione del caso clinico, gli autori analizzano tutta una serie di criticità che, secondo loro, affliggono l'attuale protocollo di sorveglianza delle tossinfezioni alimentari.

P2. BIO-SIEROTIPI DI YERSINIA ENTEROCOLITICA ISOLATI DA SUINI MACELLATI IN EMILIA-ROMAGNA

Silvia Bonardi (a), Federica Salmi (a), Elisa Riboldi (a), Silvia Tagliabue (b), Mario D'Incau (b), Franco Brindani (a)

(a) *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi, Parma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

Yersinia enterocolitica è responsabile di forme gastroenteriche nell'uomo, anche se la sua propensione alla diffusione sistemica, soprattutto nell'ospite immunocompromesso, può portare a setticemia e colonizzazione metastatica di organi interni. L'infezione da *Y. enterocolitica*, soprattutto se sostenuta dai sierotipi O:3 e O:9, può portare a sequele di natura immunitaria, segnalate in particolare nelle popolazioni scandinave HLA-B27 positive.

Il suino è considerato il serbatoio naturale di *Y. enterocolitica*. Pertanto, nel periodo gennaio 2005-novembre 2006, da 170 suini macellati presso uno stabilimento in provincia di Parma, e provenienti da 36 allevamenti della Lombardia ed Emilia-Romagna, è stato prelevato il contenuto del ceco ed è stato eseguito un tampone (mediante l'uso di spugne) da un'area di 100 cm² in corrispondenza della coscia. È stata inoltre prelevata l'acqua della vasca di scottatura delle carcasse (23 campioni nel corso di altrettanti sopralluoghi). La ricerca di *Y. enterocolitica* è stata realizzata mediante arricchimento a freddo (5 + 3°C) in PBS e piastratura su *Yersinia* CIN Agar, ad intervalli settimanali, per 5 settimane.

Y. enterocolitica è stata isolata dal contenuto intestinale del 13,5% dei soggetti (23/170), mentre le carcasse sono risultate contaminate nella misura del 4,7% (8/170). Dal ceco dei suini si sono anche isolate *Y. frederiksenii* (8,2%), *Y. intermedia* (7,1%) e *Y. kristensenii* (5,9%). Rispettivamente, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia* sono state isolate anche dall'1,2% e dallo 0,6% delle carcasse. Dal 17,4% (4/23) dei campioni dell'acqua della vasca di scottatura è stata isolata *Y. enterocolitica*, mentre dall'8,7% si è isolata *Y. kristensenii*.

Su un totale di 35 ceppi di *Y. enterocolitica*, 20 (57,1%) risultavano appartenere al sierotipo O:9/biotipo 3, mentre 10 (25,7%) sono stati identificati come ONT/1A. Tra i bio-sierotipi di *Y. enterocolitica* ritenuti altamente patogeni per l'uomo, si segnala l'isolamento di un ceppo (2,6%) appartenente al sierotipo O:3/ biotipo 4 (acqua della vasca di scottatura) e di uno stipite O:9/ biotipo 2 (contenuto intestinale). Altri ceppi sono stati identificati come O:8/biotipo 1A e O:9 biotipo 1A.

L'escrezione fecale di *Y. enterocolitica* ha seguito un andamento stagionale, coincidendo con i mesi più freddi dell'anno (da ottobre a marzo).

Dalla presente indagine emerge con chiarezza il ruolo del suino come riserva di stipiti patogeni di *Y. enterocolitica* e la possibilità di contaminazione delle carcasse in sede di macellazione. In particolare, si segnala la presenza dei sierotipi O:3 e O:9, la cui infezione nell'uomo è frequentemente associata a sequele di natura immunitaria, e l'isolamento di *Y. enterocolitica* O:3/ biotipo 4, responsabile del maggior numero di infezioni umane a livello mondiale.

P3. SIEROTIPI DI SALMONELLA ISOLATI IN SICILIA NEL BIENNIO 2004-2005

Cinzia Cardamone (a), Anna Maria Di Noto (a), Stefano Reale (a), Enza Maria Russo Alesi (a), Daniela Nifosi (b), Aurora Aleo (c), Caterina Mammìna (c)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

(b) Ispettorato Veterinario, Assessorato Regionale Sanità, Palermo

(c) Dipartimento Igiene e Microbiologia, Università degli Studi, Palermo

La possibilità che stiptipi multiresistenti di *Salmonella* spp. vengano trasmessi all'uomo attraverso la catena alimentare, in particolare con il consumo di prodotti carnei di origine suina, aviaria o bovina, è fonte di notevole preoccupazione. Gli alimenti rappresentano il punto di esposizione più prossimo al consumatore e i dati sulla loro eventuale contaminazione da *Salmonella*, con particolare riguardo all'eventuale presenza di stiptipi multi-resistenti, possono fornire un quadro epidemiologico rappresentativo della prevalenza di resistenze agli antibiotici in microrganismi patogeni con un'ecologia strettamente legata al contesto degli allevamenti. Nel periodo aprile 2004-ottobre 2005 sono stati analizzati 917 campioni di alimenti di diversa tipologia e *Salmonella* spp. è stata isolata in 44 campioni. I sierotipi isolati con maggiore frequenza sono risultati *Derby* (30,4%), *Wien* (13%), *Hadar* (8,7%) e *Typhimurium* (8,7%). In particolare, la frequenza di isolamento più elevata è stata rilevata nei campioni di muscolo suino (9,1%), seguiti dai campioni di volatili (6,0%). Riguardo all'associazione dei sierotipi con le fonti animali di provenienza, nei volatili è stata identificata una notevole varietà di sierotipi, con la maggiore presenza di *Hadar* (36,4%), seguita da *Infantis* (18,2%) e dai sierotipi *Blockley*, *Bredeney*, *Heidelberg* e *Muenchen* (9,1%). Invece la varietà di sierotipi di *Salmonella* identificati da suino è più limitata: *Derby* (48%) ha, infatti, mostrato la prevalenza più elevata, seguita da *Wien* (24%) e *Typhimurium* (16%). Su 46 degli stiptipi di *Salmonella* isolati è stata valutata la resistenza a 17 antibiotici. Il 26,1% degli stiptipi è risultato sensibile a tutte le molecole saggiate mentre il 41,3% mostrava resistenze inferiori a quattro antibiotici. È evidente, inoltre, che le resistenze tendono a raggrupparsi in *cluster*: infatti, il 13,0% degli stiptipi saggiati è risultato resistente ad almeno 4 chemioantibiotici, mentre il 10,9% a 5 e l'8,7% a più di 5. Dallo studio delle caratteristiche fenotipiche dell'antibioticoresistenza, emerge l'associazione della multiresistenza con sierotipi largamente diffusi nell'ambiente zootecnico e nella filiera alimentare, quali *Blockley*, *Hadar*, *Heidelberg*, *Panama*, *Typhimurium* e *Wien*. Nella diffusione di microrganismi patogeni multiresistenti gli alimenti giocano un ruolo di primaria importanza. I sistemi di sorveglianza e di controllo devono, quindi, attribuire priorità agli aspetti relativi alle resistenze ai chemioantibiotici, in considerazione delle possibili conseguenze negative anche in ambito clinico, sia in termini di fallimenti terapeutici sia di limitazioni nelle opzioni di scelta dei farmaci.

CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA* PRODUTTORI DI UNA B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO (SHV-12) ISOLATI DA POLLAME NEL 2005-2006

Giuseppina Chiaretto, Paola Zavagnin, Claudio Minorello, Cristina Saccardin, Marzia Mancin, Antonia Ricci

Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

A livello mondiale, il numero di *Salmonelle* resistenti alle cefalosporine a spettro esteso isolate da casi umani è sorprendentemente aumentato a partire dalla fine degli anni '90 ad oggi, creando una notevole allerta sanitaria. Le cefalosporine sono infatti farmaci di prima scelta nella cura delle infezioni sistemiche sostenute da *Salmonella*, soprattutto nel bambino e nell'anziano.

Negli animali, che rappresentano il principale serbatoio per numerose *Salmonelle* non-tifoidee a potenziale zoonotico, le segnalazioni di isolati resistenti alle cefalosporine a spettro esteso sono invece piuttosto limitate.

I meccanismi coinvolti in questo tipo di resistenza riguardano principalmente la produzione di β -lattamasi plasmidiche denominate, secondo la classificazione di *Ambler*, di classe A (extended-spectrum β -lactamases ESBLs) e C.

Nel periodo 2005-2006 dieci ceppi di *S. Livingstone*, un ceppo di *S. enteritidis*, PT6, e un ceppo di *S. Braenderup* sono stati selezionati sulla base della resistenza o della ridotta sensibilità verso cefotaxime e/o ceftazidime tra i 3.337 ceppi di *Salmonella* sottoposti ad antibiogramma. Il fenotipo ESBL è stato inizialmente indagato mediante test fenotipici e successivamente l'identificazione dei geni *bla* è stata effettuata mediante PCR e sequenziamento. I ceppi di *S. Livingstone* sono stati inoltre tipizzati mediante PGFE e RAPD-PCR per stabilire il grado di correlazione genetica. I dodici ceppi di *Salmonella* in studio erano stati isolati da pollame proveniente da diversi allevamenti nel nord est Italia. Tutti gli isolati erano produttori di una ESBL di tipo SHV-12. I ceppi di *S. Livingstone* sono risultati geneticamente correlati. Inizialmente, l'analisi mediante PFGE non ha consentito di ottenere profili di macroresistenza interpretabili, mentre l'analisi di RAPD-PCR ha fornito profili elettroforetici indistinguibili o che differivano per un'unica banda.

Il presente studio mette in evidenza l'importanza di monitorare e di caratterizzare la resistenza alle cefalosporine a spettro esteso negli isolati di *Salmonella* di origine animale per prevenire la disseminazione di ceppi resistenti e la trasmissione all'uomo attraverso la catena alimentare.

VASTA EPIDEMIA IDRICA DI GASTROENTERITE DA NOROVIRUS E ROTAVIRUS IN PUGLIA-2006

Maria Chironna (a), Cinzia Germinario (a), Rosa Prato (a), Anna Sallustio (a), Domenico Martinelli (a), Giovanni Caputi (a), Antonella Mincuzzi (a), Rosanna Mongelli (a), Tatiana Battista (a), Michele Conversano (b), Michele Quarto (a)

(a) *Sezione di Igiene, Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università degli Studi, Bari, Osservatorio Epidemiologico Regione Puglia (OER-Puglia)*

(b) *Dipartimento di Prevenzione, ASL, Taranto*

Alla fine di luglio 2006, dalla ASL di Taranto, veniva segnalato all'OER-Puglia un insolito incremento di accessi al pronto soccorso e di ricoveri di soggetti con gastroenterite acuta/diarrea. L'indagine epidemiologica ha consentito di ricostruire l'epidemia verificatasi nella provincia di Taranto. Tra maggio e settembre 2006, 2.680 soggetti sono afferiti al pronto soccorso o sono stati ricoverati per gastroenterite acuta/diarrea. Un primo picco di incidenza di casi si è verificato alla fine di giugno ed un secondo picco a fine luglio. L'età media dei soggetti era di 25 anni; il 19% dei soggetti con gastroenterite/diarrea aveva meno di 5 anni, il 16% tra 5 e 15 anni e il 65% oltre i 15 anni. Tassi d'attacco più elevati sono stati evidenziati nella città di Taranto (9,5 casi/1000 ab.). È stato eseguito uno studio caso-controllo per individuare la possibile fonte di infezione e sono stati collezionati i campioni di feci di 70 soggetti e 44 campioni di acqua, tra i possibili veicoli di infezione, sia da rubinetto sia direttamente dai serbatoi dell'acquedotto che servono la provincia di Taranto. Sono stati eseguiti controlli anche su diversi campioni di molluschi bivalvi commercializzati nella città di Taranto. Lo studio caso-controllo ha evidenziato, quale fattore di rischio significativamente associato ai casi, il consumo di acqua di rubinetto (OR=2; 95% CI 1.23-3.36) o di acqua di incerta origine (OR=3.9; 95% CI 1.41-10.54) nelle 72 ore precedenti l'esordio clinico. Esami microbiologici di routine sui campioni di feci non hanno evidenziato la presenza di enteropatogeni di origine batterica o protozoaria, mentre indagini virologiche eseguite con tecniche molecolari (PCR) hanno evidenziato la presenza di *Norovirus* (NV) nel 40% dei casi e di *Rotavirus* (RV) nel 48%. I campioni di mitili sono risultati idonei in riferimento agli indici microbiologici e negativi per la ricerca di virus NV e RV. Tecniche di filtrazione/eluizione/concentrazione di 1-2L di acqua associate a tecniche di rilevamento molecolari hanno consentito di verificare la presenza di NV e RV rispettivamente nel 9% e nel 25% dei campioni di acqua. Contemporanea presenza di NV/RV è stata evidenziata nel 2% dei campioni. La tipizzazione molecolare di NV e di RV ha consentito di verificare la sostanziale identità dei ceppi virali dei casi e dei campioni di acqua. In particolare, la tipizzazione mediante sequenziamento ha mostrato la presenza della nuova variante GII.4 di NV e la presenza di RV G9. Controlli sequenziali sui serbatoi e lungo l'intera rete di distribuzione non hanno permesso di stabilire l'origine della contaminazione anche se non sono stati esclusi problemi a livello degli impianti di clorazione. Ad oggi l'epidemia di Taranto rappresenta la più vasta epidemia di gastroenterite virale in Italia associata a consumo di acqua potabile.

P4. SIEROTIPIZZAZIONE E RICERCA DI GENI DI VIRULENZA IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE IN CORSO DI FOCOLAI DI MALATTIA

Elena Circella (a), Donato Pennelli (b), Silvia Tagliabue (b), Giordano Bruni (a), Antonio Lavazza (b), Patrizia Battista (a), Antonio Camarda (a)

(a) *Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Sezione di Patologia Aviare, Università degli Studi, Bari*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

Un totale di 117 *Escherichia coli* isolati in corso di focolai di malattia da organi (fegato, milza, sangue del cuore) di galline ovaiole decedute per colibacillosi (84 stipiti) e da tamponi cloacali di soggetti sani (33 stipiti) provenienti da 23 diversi allevamenti intensivi del sud Italia, sono stati sierotipizzati e sottoposti a *PCR-multiplex* per la ricerca di geni di virulenza (*iss* - *increased serum survival protein*, *tsh* - *temperature-sensitive hemagglutinin*, *cva* - *colicin V plasmid*).

La sierotipizzazione, effettuata utilizzando un pannello di 37 antisieri, ha consentito di caratterizzare il 56% degli isolati. La distribuzione dei sierotipi è risultata diversa a seconda dell'origine dei ceppi. Infatti, gli *E. coli* isolati dai soggetti ammalati appartenevano in particolare al sierogruppo O78 (40%), O2 (12,8%) e O128 (12,8%), mentre il sierogruppo più frequentemente associato agli stipiti isolati dai tamponi cloacali risultava O139 (22,2%). Inoltre, dalle galline con colibacillosi sono stati evidenziati anche i sierotipi O1, O88, O128, O49, e O153 mentre agli stipiti di origine fecale appartenevano i sierotipi O11, O15, O21, O157. Particolarmente interessanti i risultati scaturiti dalla ricerca dei geni di patogenicità. Infatti, gli isolati provenienti dagli animali ammalati veicolavano *iss*, *tsh* e *cva* in percentuali rispettivamente del 83,33% 46,43% e 64,29%. Queste percentuali si riducevano significativamente negli *E. coli* isolati da tamponi cloacali, giungendo a valori del 48,48%, 9% e 12,12% per i predetti geni.

Questi ultimi potevano essere associati in uno stesso ceppo e conferirgli, pertanto, una maggiore potenziale virulenza. Infatti, il genotipo *iss-tsh-cva* era riscontrabile nel 46,5% degli *E. coli* associati a malattia e solo nel 9,1% di quelli provenienti da galline sane. Al contrario il 51,5% degli *E. coli* isolati dai tamponi cloacali non presentava alcun gene di virulenza, mentre solo il 3,3% presentava il profilo *iss-cva* che caratterizzava invece il 17,8% degli isolati provenienti dagli animali con colibacillosi. Associando il profilo genetico al sierotipo si è potuto osservare che tutti gli *E. coli* appartenenti al sierogruppo O78 e O2 e isolati dai soggetti ammalati presentavano il tipo genetico *iss-tsh-cva*.

In conclusione, i risultati del presente lavoro confermano il ruolo patogeno di alcuni particolari stipiti di *E. coli*, appartenenti a specifici sierogruppi (ad esempio O78 ed O2) portatori di fattori di virulenza associati (*iss-tsh-cva*). Le ricerche, inoltre, hanno evidenziato l'affidabilità della tipizzazione genetica come strumento diagnostico in episodi di malattia e la sua validità come ausilio in indagini epidemiologiche volte ad approfondire alcune caratteristiche di patogenicità degli stipiti circolanti sul territorio.

P5. PIATTO UNICO: TIRAMISÙ

Annarita Citarella (a), Anna Romano (b), Elena Fossi (a), Danila Carlucci (c)

(a) Servizio Epidemiologia e Prevenzione, ASL BNI, Benevento

(b) Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, Benevento

(c) Servizio Veterinario Igiene degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento di Prevenzione ASL BNI, Benevento

Il 29 giugno, due giorni dopo una festa per il compleanno di un bambino, in una famiglia di un paese di campagna della provincia di Benevento, arriva la segnalazione dall'ospedale di due casi di gastroenterite. Uno dei pazienti al momento del ricovero attribuisce la sintomatologia alla ingestione di un tiramisù preparato dai padroni di casa..

La segnalazione viene valutata dai Servizi Epidemiologia e Igiene degli Alimenti del Dipartimento di Prevenzione.

Viene effettuata l'indagine epidemiologica presso i familiari dei ricoverati.

Dall'indagine risulta che:

- in data 27-6 c'è stata una festa di compleanno a casa dei signori L., durante la quale è stato offerto un tiramisù;
- il tiramisù è stato consumato da 16 persone;
- il dolce, unico alimento consumato durante la festa, è stato preparato con mascarpone e uova di produzione propria;
- delle 16 persone che l'hanno consumato 5 sono state ricoverate per sintomatologia diarroica ed altre 9 hanno ricevuto cure domiciliari, quindi il 90% delle persone che hanno consumato il dolce si è ammalato;
- la gravità del quadro clinico è correlato con la quantità di alimento ingerito, facendo pensare ad una alta carica infettante: un bambino goloso che ne ha mangiato più di tutti è quello che sta peggio;
- il quadro clinico e i tempi di insorgenza della sintomatologia fanno sospettare una tossinfezione da *Salmonella*, poi confermata dalle indagini di laboratorio.

Del dolce non è rimasto alcunché, per cui non è possibile fare prelievi campione.

Vengono intervistate anche le persone che si sono occupate della preparazione del tiramisù, allo scopo di verificare se le modalità della sua preparazione possano giustificare la contaminazione da *Salmonella*. La persona che ha preparato il dolce lo ha assaggiato durante la preparazione e il mattino successivo ha avuto i sintomi gastroenterici, facendo ipotizzare una contaminazione presente già al momento del confezionamento.

Viene coinvolto il Servizio Veterinario che provvede a campionare le uova residue, prodotte dalle galline dei signori L., per la ricerca di *Salmonella*.

La *Salmonella* viene riscontrata nei gusci, tuorli ed albumi e alla tipizzazione risulta essere la stessa rilevata nelle feci dei pazienti: *Salmonella enteritidis*.

La conclusione è che nelle uova utilizzate, contaminate da *Salmonella*, c'è stata una moltiplicazione durante la loro conservazione a temperatura ambiente per alcuni giorni.

In uova contaminate conservate a temperature comprese tra 20° e 30°C la crescita microbica avviene rapidamente. All'epoca dell'accaduto sono state raggiunte temperature ambientali di 40°C.

INDAGINE SU *ESCHERICHIA COLI* O157 IN MALGA: ANALISI SU PRODOTTI, ANIMALI E AMBIENTE

Gabriella Conedera (a), Claudio Gortani (b), Antonio Frezza (b), Chiara Targhetta (a), Renzo Mioni (c)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Cordenons, Pordenone*

(b) *Servizio Veterinario, ASS 3 Alto Friuli, Tolmezzo, Udine*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Infezioni umane da *Escherichia coli* verocitotossici (VTEC) O157 causate da consumo di latte non pastorizzato e di formaggi a base di latte crudo sono state segnalate in vari paesi, anche con eventi epidemici; tuttavia l'isolamento del microrganismo non è frequente da tali alimenti.

Nell'ambito di un piano attuato da un'Azienda Sanitaria del Friuli Venezia Giulia per valutare la sicurezza alimentare dei prodotti di malga, sono stati eseguiti controlli microbiologici su latte e formaggi, soprattutto su quelli a maggior rischio, in 10 alpeggi caratterizzati da trasformazione diretta del latte e attività agrituristica.

Sono stati analizzati per VTEC O157, 53 campioni (latte, panna, burro, caciotta, stracchino, ricotta, yogurt) prelevati nel corso di due sopralluoghi condotti per ciascun alpeggio nei mesi di luglio e agosto 2006; VTEC O157 è stato isolato da un campione (1,9%), rappresentato da stracchino.

Conseguentemente a ciò, nella malga di origine è stata effettuata un'indagine su VTEC O157 in animali, ambiente di mungitura e di caseificazione. L'analisi di prelievi rettali da 25 delle 100 bovine in lattazione presenti in malga ha evidenziato 7 capi positivi (28%), provenienti da 5 diversi allevamenti. Nella sala mungitura sono risultati positivi per VTEC O157 campioni di feci, tamponi effettuati sulle guaine dei gruppi e sui quadri di mungitura, dispositivi pre e post *dipping*, nonché il filtro dell'impianto, indicando un elevato livello di contaminazione di tale zona. Sono invece risultati tutti negativi i prelievi ambientali (vasche, pareti, caldaia, attrezzature) effettuati nella zona di caseificazione, collocata in un edificio distante dal precedente e con buone caratteristiche igieniche, come pure latte e prodotti lattiero caseari prelevati in due sopralluoghi.

Questa indagine dimostra come il rischio di contaminazione da vtec o157 di latte e prodotti a base di latte crudo non vada sottovalutato, soprattutto all'alpeggio ove aspetti ambientali e strutturali limitano l'applicazione di corrette pratiche igieniche di mungitura e lavorazione; vari fattori inoltre possono favorire l'escrezione fecale di vtec o157 degli animali (trasporto, rimescolamento, variazioni alimentari e ambientali) e la sua circolazione. La pulizia della mammella, l'igiene degli ambienti di mungitura e di caseificazione rappresentano punti critici rilevanti per limitare il rischio di contaminazione e cross-contaminazione dei prodotti, su cui va orientata una periodica formazione dei malgari. Ove compatibili, il trattamento termico del latte, la stagionatura dei formaggi, la rinuncia a produrre alcuni formaggi più a rischio che spesso esulano dalle produzioni tradizionali, possono contribuire ad aumentare la sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti.

P6. MOLLUSCHI LAMELLIBRANCHI: INFLUSSO DEI FATTORI AMBIENTALI SULLA CONTAMINAZIONE VIRALE

Chiara Corrain (a), Giuseppe Arcangeli (a), Luca Fasolato (a), Amedeo Manfrin (a), Emanuele Rossetti (b), Elisa Piazzini (c), Renzo Mioni (c), Enrico Pavoni (d), Marina Nadia Losio (d), Giuliana Sanavio (e), Elisabetta Suffredini (f), Luciana Croci (f)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Adria, Rovigo

(b) Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine, Porto Tolle, Rovigo

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(e) Agenzia Regionale Protezione Ambiente Veneto, Rovigo

(f) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL) rappresentano una importante fonte proteica nella dieta mediterranea e costituiscono una porzione significativa della produzione ittica nazionale. A causa della loro natura di animali filtratori, tuttavia, tali prodotti trattengono e concentrano nel loro organismo, insieme al plancton necessario per il loro metabolismo, anche microrganismi patogeni, come i virus enterici, eventualmente presenti nell'ambiente, diventando pertanto veicolo di una elevata varietà di sindromi gastroenteriche nell'uomo.

Allo scopo di meglio comprendere l'influenza dei fattori ambientali sulla contaminazione virale dei MEL è stata condotta un'indagine su un'area di produzione del delta del Po, monitorando la presenza di Epatite A e *Norovirus* (HAV e NoV) in mitili e vongole veraci raccolti in tre differenti zone (due aree lagunari ed un'area marina antistante la laguna) ed effettuando, contestualmente, il rilievo dei principali parametri ambientali (pH, ossigeno, salinità e temperatura delle acque di raccolta). I prelievi sono stati condotti a cadenza quindicinale per la durata di un anno, analizzando i campioni provenienti dalle aree lagunari sia prima che dopo il processo di depurazione richiesto dalla normativa.

Tenendo conto delle naturali variazioni dovute alla stagionalità, i parametri ambientali si sono mantenuti pressoché costanti nelle zone di campionamento, con un leggero abbassamento dei valori di salinità nei periodi invernali in relazione alla maggiore piovosità della stagione. Dal punto di vista microbiologico, il monitoraggio ha evidenziato l'assenza di contaminazione da parte di virus HAV in tutti i campioni analizzati, mentre 7 campioni (mitili e vongole non depurati) sono risultati positivi per NoV di genogruppo II (6 campioni contaminati con genotipo GGII.4, uno con genotipo GGIIb). In particolare tali positività sono state riscontrate in corrispondenza dei periodi di aumento della portata del fiume affluente e potrebbero essere collegati alla risospensione dei sedimenti del fondale lagunare, con maggior probabilità di contaminazione virale nei bivalvi. Tanto i campioni depurati quanto quelli prelevati a distanza di quindici giorni dalle positività rilevate, sono risultati esenti da contaminazione. I dati ottenuti risultano utili ai fini della prevenzione, suggerendo un rafforzamento dei controlli nei periodi di intensificazione degli eventi piovosi.

P7. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E ANALISI DELLE SEQUENZE CODIFICANTI I FATTORI DI RESISTENZA IN *CAMPYLOBACTER* SPP. ISOLATI NEL PERIODO 2004-2006

Antonella Costa, Fabrizio Vitale, Anna Maria Di Noto, Giuseppe Cascone, Vincenzina Alio, Fabio Ruggeri, Stefano Reale
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

L'emergenza di resistenze ai farmaci antimicrobici in quei microrganismi responsabili di principali infezioni enteriche come *Salmonella* o *Campylobacter* propone nuovi problemi in materia di sanità pubblica, coinvolgendo sia la medicina umana che la medicina veterinaria.

Riguardo a *Campylobacter*, l'introduzione dei fluorochinoloni in avicoltura, in particolare dell'enrofloxacin, ha comportato un notevole incremento nella frequenza di isolamento da pollame e carni di pollo di stipiti resistenti a questi antibiotici. Dati di letteratura evidenziano come le resistenze ai fluorochinoloni siano trasmesse mediante plasmidi e siano dovute a mutazioni puntiformi che selezionano ceppi altamente resistenti: la resistenza alla ciprofloxacina, è stata associata a mutazioni puntiformi nel codone 86 del gene *gyrA* mentre in ceppi resistenti all'eritromicina sono state osservate mutazioni nei geni dell'rRNA 23S. In quest'ultimo caso risulta modificato il target ribosomiale dei macrolidi.

In questo lavoro sono stati valutati, mediante il metodo di diffusione in piastra, i profili di resistenza a 17 antibiotici (colistina, sulfametoxazolo/trimetoprim, kanamicina, gentamicina, acido nalidixico, tetraciclina, ampicillina, streptomina, cloramfenicolo, cefalotina, ciprofloxacina, eritromicina, cefotaxime, amoxicillina/acido clavulanico, neomicina, enrofloxacin, ceftazidime) in 25 stipiti di *Campylobacter* spp: di cui 17 identificati come *C. jejuni*, 3 come *C. coli* e 5 come *C. upsaliensis*, isolati da carni di pollo e carni suine. In parallelo è stato avviato uno studio biomolecolare per individuare le mutazioni che caratterizzano i ceppi di *Campylobacter* resistenti all'eritromicina e alla ciprofloxacina. In particolare è stato ottimizzato un sistema di amplificazione rispettivamente per il gene 23S rRNA e per il gene *gyrA*. Gli ampliconi ottenuti sono poi stati sequenziati e confrontati con le sequenze dei genotipi wild-type residenti in GenBank. Particolarmente elevata è risultata la percentuale di stipiti di *C. jejuni* resistenti ad acido nalidixico e ciprofloxacina (53%) e la percentuale di resistenza a tetracicline (64,7%), enrofloxacin, sulfametoxazolo/trimetoprim e eritromicina (41%). Ceppi multiresistenti di *C. jejuni* sono stati osservati, in particolare, in campioni di volatili prelevati alla produzione. Gli isolati di *C. coli* hanno evidenziato resistenza a chinoloni, tetraciclina e ampicillina. Tutti i ceppi isolati sono risultati sensibili agli aminoglicosidi (gentamicina, neomicina e kanamicina). Inoltre i risultati ottenuti dalla indagine biomolecolare hanno confermato la presenza delle mutazioni puntiformi attese, che portano alla transizione da un amminoacido ad un altro nella catena delle corrispondenti proteine. Dall'analisi di questi dati si evince come lo studio fenotipico e genotipico dei determinanti di resistenza, con l'uso di metodologie classiche e di biologia molecolare, contribuisce a comprendere in misura sempre maggiore il meccanismo dell'antibiotico resistenza e della sua diffusione.

QUALITÀ IGIENICO SANITARIA DEL LATTE CRUDO ALLA STALLA ED AL CONSUMO IN REGIONE LOMBARDIA

Paolo Daminelli, Guido Finazzi, Elena Cosciani Cunico, Franca Rossi, Emanuela Bonometti, Silvia Todeschi, Marina Nadia Losio, Barbara Bertasi, Paolo Boni
Dipartimento Alimenti e Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

La vendita diretta del latte crudo ha tratto notevole impulso nel corso del 2005 grazie alla diffusione di distributori automatici dislocati nel territorio in punti considerati strategici per il contatto con il consumatore aprendo un nuovo settore di attività nel comparto agro-alimentare. Sebbene rappresenti un fenomeno commercialmente limitato rispetto alla produzione regionale di latte bovino l'iniziativa ha coinvolto più di 100 allevatori destando notevole interesse sia tra gli addetti ai lavori, che tra i consumatori.

La quasi contemporanea applicazione dei provvedimenti comunitari sulla sicurezza alimentare (cosiddetto "Pacchetto Igiene") ha indotto l'Unità Operativa Veterinaria Regionale ad avviare di concerto con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, un programma di sorveglianza e monitoraggio finalizzato a definire le caratteristiche qualitative del latte crudo, le fasi del processo di produzione e distribuzione creando la base informativa necessaria a sviluppare l'analisi del rischio.

Le aziende agricole coinvolte nel piano di monitoraggio sono state in totale 167. In particolare, è stato analizzato il latte di massa aziendale e quello distribuito da 176 erogatori (95 aziendali, 34 posti presso esercizi commerciali, 47 installati in aree pubbliche).

Complessivamente sono stati analizzati più di 1.000 campioni nel periodo settembre 2005-giugno 2006; i prelievi dal *tank* aziendale sono stati analizzati per parametri igienico-sanitari (carica batterica totale, cellule somatiche, inibenti), merceologici (grasso, proteine, lattosio) e microbiologici (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* termotolleranti); questi ultimi sono stati utilizzati anche per la valutazione dei campioni prelevati ai distributori, con l'aggiunta della ricerca di *E. coli* O 157 H:7. Le metodiche analitiche per i parametri microbiologici hanno previsto lo screening con metodiche PCR, seguito in caso di positività dal metodo colturale per l'isolamento del ceppo batterico ed eventuale ribotipizzazione genonica.

Il latte crudo posto alla vendita diretta è apparso complessivamente di buona qualità igienico-sanitaria corrispondendo, in linea generale, alla elevata qualità del latte prodotto in Regione Lombardia; lo screening in PCR ha evidenziato una positività per *Salmonella* spp del 1,48%, per *Listeria monocytogenes* del 2,47%, per *Campylobacter* termotolleranti del 0,29% per *E. coli* O 157 H:7 del 10%. La metodica colturale ha permesso di isolare 1 solo ceppo di *Salmonella* spp e due ceppi di *Listeria monocytogenes*.

Le caratteristiche dell'alimento, le modalità di distribuzione e di consumo impongono la necessità di mantenere un elevato livello di sorveglianza igienico sanitaria affiancato dalla necessità di fornire al consumatore un'adeguata informazione circa i pericoli legati al consumo del latte crudo, i tempi di conservazione e le corrette modalità di consumo.

P8. QUALITÀ MICROBIOLOGICA DI PRODUZIONI AVICOLE

Maria De Giusti, Daniela Tufi, Lucia Marinelli, Caterina Aurigemma, Carolina Marzuillo, Antonio Boccia

Sezione di Medicina Clinica e Sanità Pubblica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi La Sapienza, Roma

È stata valutata la qualità microbiologica e la sicurezza igienica di prodotti avicoli nazionali commercializzati nell'area metropolitana di Roma.

Nel periodo novembre 2005-gennaio 2006 sono stati analizzati 87 campioni avicoli comprendenti 28 petti di pollo (32,18%); 29 sovracoscio con pelle (33,34%) e 30 sovracoscio senza pelle (34,48%) per la ricerca di: Carica Mesofila Totale (UNI ISO 4833/03); *Escherichia coli* (ISO 7251/05); *Staphylococcus aureus* (ISO 6888-1/03); Anaerobi solfito riduttori (ISO 15213:2003); *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1/04) e *Salmonella* spp. (ISO 6579/02).

Per la ricerca dei microrganismi appartenenti alla specie *Listeria monocytogenes* ed al genere *Salmonella* spp. ci siamo avvalsi, unitamente al metodo colturale ISO, anche di un sistema PCR automatizzato (*BAX® System-DuPont Qualicon*, validato AFNOR/AOAC) con rilevazione automatica in fluorescenza degli amplificati.

Solo 11/87 campioni sono risultati negativi a tutti i parametri ricercati; 76/87 hanno mostrato valori medi di Carica Mesofila Totale di 13.919 ufc/g (mediana 1.118; range 0-273.667) e 37/87 valori medi di *Escherichia coli* di 254,77 ufc/g (mediana 0, range 0-4.300). Circa il 6% dei campioni (5/87) sono risultati non conformi per *Escherichia coli* (PHLS,2000 e Reg. 2.073/2004/CE) di cui 1 petto di pollo; 2 sovracoscio con pelle e 2 sovracoscio senza pelle. Sempre assente *Staphylococcus aureus*.

Le sole positività per *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. sono state riscontrate nel prodotto sovracoscio senza pelle (2/29) con metodica PCR-Bax, non confermata con il metodo colturale ISO. La presenza di Anaerobi solfito-riduttori è stata rinvenuta sempre in campioni di sovracoscio senza pelle (2/29) anche se con bassi livelli di carica (range 0-9 MPN/g).

Valori medi di Carica Mesofila Totale ed *Escherichia coli* più elevati nei campioni di sovracoscio senza pelle (19.591 ufc/g e 281,83 MPN/g) rispetto a sovracoscio con pelle (16.271 ufc/g e 262,93 MPN/g) e petto di pollo (5.405 ufc/g e 217,32 MPN/g), probabilmente da ricondursi alle fasi del processo che comportano maggiore manipolazione.

L'analisi dei dati è stata effettuata con software STATA 8.0. Le differenze tra le medie della Carica Mesofila Totale sono state analizzate mediante l'analisi della varianza ad un criterio di classificazione e la procedura di Bonferroni ($F=1,26$ $p=0,2885$). I risultati sono stati confermati con il test di *Kruskal-Wallis* (chi-quadrato=5.082 con 2 df $p=0,0788$). Tutti i test hanno evidenziato differenze statisticamente non significative anche per il parametro *Escherichia coli* ($F=0,05$ $p=0,9469$; chi-quadrato=7,661 con 2 df $p=0,0217$).

Globalmente i risultati microbiologici descrivono prodotti di ottima qualità e processi produttivi rispondenti agli standard di Buona Pratica di Lavorazione.

INDAGINE RETROSPETTIVA SULLA PRESENZA DI STIPITI DI *SALMONELLA* 4,[5],12:i:-, ISOLATI DA UOMO, ALIMENTI ED ANIMALI NEGLI ANNI 1995-2007, NELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

Paola De Santis (a), Rita Tolli (a), Ida Luzzi (b), Lucia Scaramella (a), Daniela Colonna (a),
Gina Di Giampietro (a), Maria Grazia Marrocco (a), Stefano Bilei (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore
di Sanità, Roma*

Nel rapporto annuale su *Salmonella* per l'anno 2004, il Centro di Prevenzione e Controllo delle Malattie trasmesse con gli alimenti (CDC, Atlanta, USA), riporta la frequenza dei 20 sierotipi più comunemente isolati di *Salmonella*, tra i quali il sierotipo 4,[5],12:i:- si colloca al 7° posto per frequenza d'isolamento sia dall'uomo sia dagli animali. Identificato in Spagna dal 1997, è il quarto più comunemente isolato nel 1998 nello stesso paese. In Italia, il Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi animali, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ha segnalato un aumento degli isolamenti del sierotipo 4,[5],12:i:-, che passa dal 3,51% del 2004 al 5,42% del 2005 e che si conferma in crescita costante a partire dal 2002, anno in cui è stato attivato il sistema Enter-vet. Uno studio retrospettivo effettuato in Brasile e riferito agli anni 1985-1999, ha dimostrato la presenza del sierotipo 4,[5],12:i:-, già a partire dal 1985, segnalazioni in altri paesi risalgono al 1993 in Thailandia, e al 1997 in Spagna e USA. Il presente studio prende in esame complessivamente 8.336 stipiti di *Salmonella* di origine veterinaria e umana, isolati durante gli anni 1995-2006 nelle Regioni Lazio e Toscana. Tutti i ceppi sono stati sierotipizzati secondo lo schema di *Kaufmann-White* presso l'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana, Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni; i ceppi identificati come sierotipo 4,[5],12:i:-, sono stati confermati mediante PCR multiplex secondo il metodo messo a punto da Echeita. La frequenza di isolamento del sierotipo 4,[5],12:i:- negli anni 2002-2006 ha evidenziato un andamento in crescita passando dal 1,0% al 9,2% del 2006 nel caso degli stipiti isolati dall'uomo. Lo studio retrospettivo realizzato utilizzando i ceppi di *Salmonella* collezionati durante gli anni 1995-2001, ha consentito di individuare la presenza del sierotipo 4,[5],12:i:- già nell'anno 1996 con una frequenza dello 0,23%, mentre nessun ceppo è stato individuato tra gli isolati del 1995.

P9. ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA PRODOTTI LATTIERO-CASEARI

Anna Maria Di Noto (a), Giuseppa Oliveri (a), Cinzia Cardamone (a), Antonella Costa (a), Sonia Sciortino (a), Caterina Mammina (b)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

(b) Dipartimento Igiene e Microbiologia, Università degli Studi, Palermo

L'utilizzo degli antibiotici, sempre più diffuso sia in medicina umana che in campo veterinario, ha favorito la selezione e l'emergenza di ceppi batterici mono- o multiresistenti con conseguente rischio per la salute umana sia perché le infezioni da batteri multiresistenti rappresentano un serio problema terapeutico, sia perché i batteri possono acquisire e trasmettere orizzontalmente determinanti di resistenza ad altre specie patogene. In letteratura è ampiamente documentato il possesso di sequenze geniche di resistenza in batteri patogeni, ma non si esclude che anche microrganismi saprofiti o indicatori, con i quali condividono l'habitat, possano essere sottoposti ad analoga pressione selettiva. In questo contesto assume rilevanza la trasmissione all'uomo di microrganismi resistenti agli antibiotici attraverso il consumo di prodotti alimentari.

Il modello paradigmatico è rappresentato dagli enterococchi; si ritiene infatti che enterococchi dell'ambiente nosocomiale possano avere acquisito le resistenze ai glicopeptidi dagli enterococchi vancomicina-resistenti presenti nella catena alimentare, in particolare nei prodotti di origine avicola e suina. La probabilità che un meccanismo simile si possa realizzare anche nell'ambito di altre specie è stata in parte documentata *in vitro*, ma persiste la necessità di ulteriori studi e approfondimenti. In questo lavoro è stata valutata l'antibiotico-resistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da prodotti lattiero-caseari. In particolare, nell'anno 2006 sono stati analizzati 90 campioni, che includevano 16 campioni di latte crudo e 73 campioni di formaggi a pasta molle. Su tutti i campioni è stata valutata la carica di *Escherichia coli* che ha mostrato valori compresi tra $< 1 \times 10^1$ u.f.c. e 1.2×10^7 u.f.c./g o ml. Tutti i ceppi di *Escherichia coli* isolati sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità ai chemio-antibiotici con il metodo della diffusione in agar secondo Kirby-Bauer. Sono state saggiate le seguenti molecole: tetraciclina, cloramfenicolo, streptomina, amoxicillina/acido clavulanico, acido nalidixico, cefotaxime, ampicillina, sulfametossazolo/trimetoprim.

Si è osservato il 100% di sensibilità verso sulfametossazolo/trimetoprim, mentre le resistenze evidenziate hanno riguardato tetraciclina e streptomina per il 5,5%, cloramfenicolo per l'1,1%, amoxicillina/acido clavulanico per il 12,2%, acido nalidixico per il 4,4%, cefotaxime per l'1,1% ed ampicillina per il 32,2%. Questi risultati confermerebbero l'ipotesi che determinanti di resistenza possono essere presenti in microrganismi non patogeni e che tali determinanti possano essere introdotti nell'ecosistema umano attraverso la catena alimentare con un possibile impatto sanitario di rilevante entità nel caso in cui l'acquisizione di queste sequenze avvenga da parte di batteri che circolano in ambiente nosocomiale, come l'esperienza degli enterococchi vancomicina-resistenti ha dimostrato.

APPLICAZIONE DEL CALICIVIRUS FELINO COME CONTROLLO DI PROCESSO NELLA DETERMINAZIONE DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN MOLLUSCHI TRAMITE *REAL-TIME* PCR

Simona Di Pasquale, Luciana Croci, Mara Paniconi, Dario De Medici, Laura Toti
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I Molluschi Eduli Lamellibranchi sono stati veicoli di numerose epidemie di Epatite A in varie parti del mondo e anche in Italia, dove ad esempio una vasta epidemia fu segnalata in Puglia negli anni 1996-97 con circa 11.000 casi, e più recentemente nel 2004 in Campania con circa 800 casi.

Il rilevante pericolo per la salute pubblica dovuta alla presenza di virus enterici dei molluschi bivalvi è stata riconosciuta anche dalla Commissione Europea e nei *consideranda* del regolamento 2073/2005 si pone la necessità di fissare criteri per i virus patogeni in tali prodotti non appena saranno disponibili metodi d'analisi standardizzati. Una specifica commissione del CEN (Comitato Europeo di Normazione) sta attualmente lavorando al fine di proporre un metodo di riferimento basato sull'utilizzo della *real-time* PCR mediante l'utilizzo di sonde a fluorescenza.

Un punto fondamentale per la definizione di tale metodo è costituito dalla scelta di un adeguato controllo di processo che possa essere anche utilizzato come controllo interno di amplificazione. Recentemente è stato proposto l'utilizzo di un ceppo mutante e avirulento di *Mengovirus*, appartenente alla famiglia delle *Picornoviridae* analogamente all'HAV, che al momento, però, non è disponibile. Come alternativa a tale controllo di processo, viene proposto l'utilizzo di *calicivirus* felino commercialmente disponibile e già usato da vari autori come modello sperimentale per studiare differenti aspetti riguardo i virus enterici.

È stata sviluppata una duplex *real-time* PCR che permette la contemporanea determinazione dell'HAV e del FCV, utilizzano due sonde marcate con differenti fluorocromi, FAM per la sonda specifica per l'HAV, mentre quella per l'FCV è marcata con il fluorocromo VIC. Tale metodica è stata utilizzata per valutare l'efficacia di due metodi di estrazione e concentrazione del virus dell'epatite A da epatopancreas di molluschi bivalvi. Il primo metodo si basa sull'utilizzo della proteinasi K, mentre il secondo metodo prevede la eluizione del virus tramite un tampone di glicina e concentrazione mediante precipitazione con Polietilglicol 6000 (PEG 6000). La proteinasi K sembra dare i migliori risultati, e rileva una quantità di virus dell'HAV di circa 3-10 unità virali/provetta. Le prove hanno evidenziato l'idoneità dell'FCV come controllo di processo.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI SALMONELLA ENTERICA SIEROTIPO ENTERITIDIS E TYPHIMURIUM IN ITALIA, NEGLI ANNI 2003-2006

Anna Maria Dionisi, Emma Filetici, Ildo Benedetti, Sergio Arena, Slawomir Owczarek, Ida Luzzi

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Salmonella spp. è uno dei principali agenti di infezione gastroenterica associata al consumo di alimenti in tutto il mondo. Al fine di attuare un sistema di sorveglianza in grado di segnalare in tempo reale *clusters* epidemici a livello nazionale e internazionale sono stati attivati progetti europei come *Salmgene* (2003-2005) e *Pulsenet Europe* (dal 2005) basati sulla creazione di un archivio di profili elettroforetici di ceppi di *Salmonella* circolanti in Europa ottenuti mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE).

In questo lavoro viene riportata la distribuzione dei profili elettroforetici in associazione ai tipi fagici e ai profili di antibiotico resistenza di ceppi di *S. enteritidis* e *typhimurium* isolati in Italia, negli anni 2003-2006, nell'ambito della sorveglianza Enter-net, nonché la distribuzione dei profili relativi agli altri sierotipi frequentemente isolati nel nostro paese.

Sono stati esaminati 2.300 ceppi di *Salmonella* provenienti dai centri di riferimento della rete nazionale Enter-net; i profili ottenuti mediante PFGE sono stati analizzati con il software *Bionumerics* e a ciascun profilo è stato assegnato un nome in accordo con il database internazionale.

Per *S. typhimurium* il profilo elettroforetico più rappresentato (30%) è stato STYMXB.0079 seguito dai profili strettamente correlati STYMXB.0067 e 61 (20%). Il 40% dei ceppi con profilo STYMXB.0079 è risultato non tipizzabile per fagotipizzazione (NT), il 30% è risultato fagotipo U302 mentre i restanti ceppi appartengono ad altri fagotipi in percentuali diverse negli anni. Il 90% dei ceppi con profili STYMXB.0067 e 61 è rappresentato da ceppi con fagotipo DT104. I pattern di antibiotico resistenza ASSuT e ACSSuT sono associati rispettivamente al profilo STYMXB.0079 (75%) e ai profili STYMXB.0067 e 61 (70%).

In accordo con gli altri paesi europei, per *S. enteritidis* i profili prevalenti sono stati SENTXB.0001, 0002, 0005. Il 40% dei ceppi con profilo SENTXB.0001 appartiene al fagotipo PT1 e PT4, il resto è rappresentato da diversi tipi fagici. Il 70% dei ceppi con profilo SENTXB.0002 è rappresentato dal tipo fagico PT8 mentre al profilo SENTXB.0005 appartengono il fagotipo PT21 (50%), PT1 e PT4.

La costituzione del database di profili di PFGE si è rivelato uno strumento epidemiologico importante a livello internazionale e locale in quanto non solo permette di monitorare la circolazione di particolari cloni, principalmente di *S. enteritidis* e *typhimurium* nel nostro paese ma, associando profili elettroforetici, fagotipi e profili di antibiotico resistenza, è un sostegno ai tradizionali metodi epidemiologici per identificare eventuali veicoli d'infezione.

P10. CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E MOLECOLARE DI CEPPI DI *Y. ENTEROCOLITICA* ISOLATI DA FONTI DIVERSE

Emma Filetici, Slawomir Owczarek, Anna Maria Dionisi, Ida Luzzi
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Yersinia enterocolitica è l'unica specie del genere *Yersinia* sicuramente responsabile di gastroenteriti nell'uomo. Nella popolazione generale l'enterite da *Y. enterocolitica* (solitamente di tipo sporadico) è relativamente infrequente, colpisce più facilmente i pazienti con sovraccarico di ferro, quali i bambini politrasfusi affetti da talassemia, che vengono pertanto considerati categoria a rischio.

Il principale serbatoio animale di *Y. enterocolitica* è rappresentato dai suini e l'infezione può essere contratta attraverso il consumo di carni suine contaminate. Tuttavia *Y. enterocolitica* è ampiamente diffusa in natura, può essere isolata da acqua e latte fresco contaminati e da alimenti di origine vegetale.

In passato la biotipizzazione e la sierotipizzazione hanno rappresentato tecniche utili sia a fini tassonomici che per lo studio degli aspetti epidemiologici e rimangono a tutt'oggi metodi di riferimento.

Recentemente l'applicazione dei metodi molecolari tra cui l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) ha consentito di rafforzare ed ampliare le conoscenze tassonomiche nonché di costituire insieme a sierotipizzazione e biotipizzazione un valido schema utile ai fini epidemiologici.

Scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare sia fenotipicamente che genotipicamente ceppi di *Y. enterocolitica* isolati da fonti diverse mediante determinazione del biotipo e delle caratteristiche di virulenza del sierotipo, del profilo di antibiotico resistenza e del profilo elettroforetico ottenuto mediante PFGE.

In totale sono stati studiati 76 ceppi isolati da casi di infezioni umane e da alimenti negli anni 2004-2006.

La maggior parte dei ceppi isolati da alimento è risultata non tipizzabile sierologicamente e appartenente al biotipo 1 A, considerato "non patogeno". La PFGE ha messo in evidenza una estrema diversità dei profili elettroforetici indicando la circolazione di ceppi geneticamente non correlati. I ceppi isolati da casi sporadici di infezione umana sono risultati appartenere al biosierogruppo 4:O 3 e solo in due casi, correlati geograficamente, è stata osservata una omologia genetica.

In conclusione l'uso di test per determinare la potenziale patogenicità (biotipizzazione) di ceppi di *Y. enterocolitica* rimane un valido strumento diagnostico utile per studiare la circolazione di ceppi potenzialmente patogeni. Affiancare alla caratterizzazione fenotipica l'impiego di tecniche molecolari può consentire l'individuazione delle fonti di infezione e dei possibili serbatoi per i ceppi di *Y. enterocolitica* patogeni per l'uomo.

P11. SVILUPPO DI UN METODO PER LA RICERCA DI SALMONELLA ENTERICA IN INSACCATI FRESCHI DI SUINO TRAMITE REAL-TIME PCR

Rosa Fioravanti (a), Caterina Graziani (a), Antonia Ricci (b), Rosangela Tozzoli (a), Alfredo Caprioli (a), Stefano Morabito (a)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Le infezioni da *Salmonella* rappresentano una delle principali cause di gastroenteriti in tutto il mondo. Diversi sierotipi di *Salmonella* sono agenti patogeni zoonotici trasmessi dagli animali, che ne costituiscono il serbatoio naturale, all'uomo attraverso il consumo di alimenti contaminati. Per la ricerca di *Salmonella* spp negli alimenti viene applicato il metodo ufficiale ISO 6579 basato sulla coltura del microrganismo. Poiché i metodi colturali richiedono tempi lunghi, esiste l'esigenza di identificare metodi qualitativi e quantitativi per la ricerca di *Salmonella* negli alimenti altrettanto sensibili ma più rapidi. Lo sviluppo di diversi metodi molecolari basati sull'amplificazione del DNA ha fornito un potente supporto, soprattutto in termini di sensibilità e rapidità, per l'identificazione di agenti patogeni negli alimenti.

In questo studio è stato valutato l'utilizzo della *real-time* PCR per la ricerca di *Salmonella* in matrici alimentari in comparazione con il metodo dell'isolamento e della conta in piastra su terreni selettivi. Il sistema sperimentale prevedeva l'utilizzo di *primers* specifici per l'amplificazione del gene di virulenza *invA*, presente in tutti i *serovar* di *Salmonella* e del colorante fluorescente SYBR Green come sistema di rilevazione in tempo reale. Per l'estrazione del DNA sono stati utilizzati in parallelo tre metodi diversi: due basati su kit commerciali ed il metodo classico di estrazione con fenolo/cloroformio. Per la determinazione della sensibilità, della specificità e del limite di rilevabilità del metodo, sono state saggiate colture pure di un ceppo di *Salmonella typhimurium* isolato da suino, colture dello stesso ceppo contaminate con un eccesso di una flora di *background* e campioni costituiti da insaccati freschi di suino contaminati artificialmente. Tutti i campioni contenevano quantità note di Unità Formanti Colonie (UFC) del ceppo di *S. typhimurium* in quantità crescenti da 0 a 15.000 UFC per grammo. L'applicazione a colture pure ha mostrato una sensibilità del metodo di 3.25 UFC a fronte della capacità di rilevare circa 8 UFC del metodo ufficiale ISO 6579. L'aggiunta di flora di *background* non alterava la sensibilità del metodo che dimostrava così caratteristiche di sensibilità e specificità superiori ai metodi microbiologici. Quando la metodica è stata applicata a campioni costituiti da insaccati contaminati artificialmente, il limite di rilevabilità aumentava fino a 180 UFC per grammo di insaccato. Questa diminuzione di sensibilità è, presumibilmente, dovuta alla presenza di collagene, particolarmente abbondante nella matrice considerata che, se non completamente rimosso interferisce con l'amplificazione. La messa a punto di un metodo di estrazione del DNA efficace in grado di rimuovere completamente le sostanze inibenti è correntemente in fase di studio.

P12. LA SORVEGLIANZA DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI IN *CAMPYLOBACTER* ZONOSICI IN ALCUNE SPECIE ZOOTECHNICHE IN ITALIA

Alessia Franco (a), Alessandra Di Egidio (a), Sarah Lovari (a), Manuela Iurescia (a), Gessica Cordaro (a), Paola Di Matteo (a), Luigi Sorbara (a), Roberta Onorati (a), Antonia Ricci (b), Giuseppe Merialdi (c), Chiara Magistrali (d), Valentina Donati (a), Pasquale Gaspari (e), Oliviero Bassoli (f), Fausto Ruffini (g), Alessandro De Bassa (h), Antonio Battisti (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Reggio Emilia*

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

(e) *AUSL, Cesena*

(f) *USL Distretto di Carpi, Modena*

(g) *Veterinario Libero Professionista, Teramo*

(h) *USL Distretto di Sassuolo, Modena*

Una delle principali malattie batteriche enteriche nei paesi industrializzati è la Campylobatteriosi, sia per quanto riguarda il carico di malattia che i costi ad essa associati. È sostenuta principalmente da *Campylobacter jejuni* e in minor misura da *C. coli*. Tali agenti si riscontrano comunemente nell'intestino di animali zootecnici in buono stato di salute (specie aviarie in particolare, suini, bovini, ovini) ed in animali da compagnia e selvatici. L'uomo si infetta comunemente consumando prodotti di origine animale contaminati lungo la filiera produttiva o in seguito a cross-contaminazioni durante la preparazione degli alimenti.

Nel corso del 2005 e del 2006 il Centro Nazionale di Referenza per l'Antibioticoresistenza ha effettuato, in collaborazione con la rete degli IZZSS, campionamenti casuali di contenuti intestinali di specie aviarie (polli, tacchini), suini e bovini al macello, provenienti da aziende diverse di alcune regioni rappresentative del territorio italiano (Lazio, Toscana, Venezie, Emilia-Romagna, Abruzzo, Umbria, Marche). Presso il Centro Nazionale di Referenza per l'Antibioticoresistenza, gli isolati sono stati confermati a livello di specie mediante *Polymerase Chain Reaction* e saggiati nei confronti di un panel rappresentativo di molecole di consenso internazionale (eritromicina, ampicillina, gentamicina, acido nalidixico, ciprofloxacina, tetraciclina, sulfatrimetoprim), secondo metodica di *Minimum Inhibitory Concentration*.

Nelle specie considerate, in rapporto alle diverse condizioni di allevamento e di pressione selettiva, sono state riscontrate differenze nella prevalenze di resistenza alle molecole antimicrobiche considerate. Nell'ultimo decennio, nei paesi industrializzati si è assistito all'emergenza ed alla diffusione di resistenze ai fluorochinoloni ed ai macrolidi in *C. jejuni* e *C. coli* isolati da specie zootecniche, associato all'uso estensivo di molecole appartenenti alle suddette classi.

Dai dati ottenuti dal monitoraggio, sono state rilevate resistenze elevate ai fluorochinoloni in *C. jejuni* e *C. coli* nelle specie aviarie e *C. coli* nel suino, mentre è emergente la resistenza ai macrolidi in alcune filiere produttive. È noto che tali classi di antimicrobici rappresentano i farmaci di elezione delle infezioni invasive da *Campylobacter* nell'uomo. Il monitoraggio continuo delle resistenze in *Campylobacter* zoonosici nelle produzioni zootecniche sarà utile a fornire informazioni sempre aggiornate sulle tendenze di resistenza nei confronti di molecole preziose per la terapia delle infezioni batteriche nell'uomo e negli animali.

P13. LA SORVEGLIANZA DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI IN *ESCHERICHIA COLI* INDICATORI DA SPECIE ZOOTECHNICHE IN ITALIA

Alessia Franco (a), Alessandra Di Egidio (a), Sarah Lovari (a), Antonia Ricci (b), Giuseppe Merialdi (c), Manuela Iurescia (a), Gessica Cordaro (a), Paola Di Matteo (a), Luigi Sorbara (a), Carmela Buccella (a), Cinzia Onorati (a), Tamara Cerci (a), Serena Lorenzetti (a), Angela Ianzano (a), Fabiola Feltrin (a), Antonio Battisti (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Reggio Emilia*

Escherichia coli è un batterio commensale e patogeno opportunista, ad ecologia intestinale, di comune isolamento negli animali e nell'uomo. È sottoposto a pressioni selettive allorché vengano usati antibiotici, e può fungere da indicatore degli effetti dell'uso di antibiotici sulle popolazioni batteriche dell'uomo e degli animali. Inoltre riveste notevole importanza come potenziale serbatoio di determinanti genetici di resistenza in grado di essere trasferiti ad altri batteri patogeni e zoonosici. La loro analisi consente la comparazione tra differenti tipologie d'allevamento, tra specie animali diverse e tra diverse regimi di trattamento con antibatterici. Il Centro di Referenza per l'Antibioticoresistenza (CRAB) ha condotto, in collaborazione con vari IZZSS e Veterinari USL della rete ITAVARM, un monitoraggio sulla resistenza agli antibiotici in *E. coli* indicatori, raccolti in specie zootecniche al macello (bovini, suini, avicoli). Il campionamento è stato effettuato al macello per le specie zootecniche e il CRAB per gli animali da compagnia. I saggi di sensibilità nei confronti di panel di antibiotici di consenso internazionale sono stati eseguiti mediante la tecnica di diffusione in agar, secondo norme di riferimento *CLSI*. Dai risultati ottenuti la proporzione degli isolati resistenti alle molecole saggate varia in rapporto alla specie oggetto di studio e riflette i diversi regimi d'uso dei farmaci antimicrobici nelle produzioni zootecniche. Significative infatti risultano le differenze nelle resistenze osservate per molte delle molecole saggate. I livelli di resistenza più elevati si evidenziano per le molecole impiegate da lungo tempo in medicina veterinaria (tetraciclina, sulfamidici, streptomycin ed ampicillina) e per quelle di utilizzo "storico" ma attualmente bandite in zootecnia (cloramfenicolo). Nelle specie considerate, in rapporto alle diverse condizioni di allevamento e di pressione selettiva, sono state riscontrate differenze nelle prevalenze di resistenza a varie molecole antimicrobiche considerate. È importante rilevare che nelle specie zootecniche oggetto di campionamento, gli isolati testati hanno esitato assenza o frequenze ancora molto basse di resistenza a cefalosporine di terza generazione e ancora non elevate ai fluorochinoloni. L'obiettivo che ci si propone per il futuro è quello di continuare il monitoraggio in tutto il territorio nazionale in *E. coli* indicatori da specie zootecniche così come la Direttiva Comunitaria in materia di zoonosi (99/2003 EC) prevede per gli Stati membri.

P14. SALMONELLE TIFOIDEE SEGNALATE AL SISTEMA ENTER-NET ITALIA. ANALISI RETROSPETTIVA, ANNI 2000-2006

Pasquale Galetta (b), Anna Maria Dionisi (a), Slawomir Owczarek (a), Emma Filetici (a), Ildo Benedetti (a), Ida Luzzi (a), Partecipanti alla rete Enter-net Italia

(a) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le infezioni sostenute da *Salmonelle* tifoidee rappresentano un importante problema di sanità pubblica per i paesi in via di sviluppo. Nei paesi industrializzati la prevalenza di casi di febbre tifoide è piuttosto bassa e i pazienti a rischio sono rappresentati da soggetti che viaggiano in paesi dove questa malattia è endemica.

Il numero di isolamenti di *S. Typhi* e *Paratyphi* presenti nel database Enter-net è relativamente esiguo e la sorveglianza delle infezioni tifoidee non rappresenta un obiettivo prioritario di questo sistema di sorveglianza. Tuttavia il continuo ingresso di immigrati provenienti da paesi ad elevata endemicità di febbre e l'emergenza di ceppi di *Salmonella* tifoidee con resistenza multipla agli antibiotici impone un attento controllo di queste infezioni.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare in modo retrospettivo il database Enter-net per verificare l'andamento degli isolamenti di *Salmonelle* tifoidee negli anni, di valutare la resistenza agli antibiotici e di sottotipizzare i ceppi in modo da verificare le relazioni genetiche che tra questi intercorrono.

Dall'analisi del database Enter-net è possibile osservare come la percentuale di segnalazione di isolamenti di *Salmonella* tifoidee da casi febbre tifoide è stata sostanzialmente stabile fino al 2003; 0,62% nel 2000, 0,75% nel 2001, 0,63% nel 2002, 0,64% nel 2003. Nel 2004 si è assistito ad un sensibile aumento nel numero di isolamenti che si è mantenuto costante nei due anni seguenti (1,1% sul totale di tutti i sierotipi isolati da infezioni umane). Nel 2006 in particolare si è trattato quasi unicamente di isolamenti di *S. Typhi*. I casi riguardano prevalentemente stranieri provenienti da (o di ritorno) da paesi a elevata endemicità di tifo.

La quasi totalità dei ceppi isolati hanno mostrato resistenza ad acido nalidixico con o senza altre resistenze addizionali e tutti i ceppi acido nalidixico - resistenti hanno mostrato ridotta sensibilità a ciprofloxacina.

Ai fini epidemiologici la tipizzazione molecolare mediante PFGE rappresenta un valido strumento per la rilevazione di focolai epidemici e per la sorveglianza delle infezioni causate da *Salmonelle* tifoidee. A tal fine si è provveduto alla creazione di un database di profili elettroforetici che consente di verificare il grado di correlazione tra i ceppi isolati.

P15. ANALISI DEI PULSOTIPI DI SALMONELLA SPP. ISOLATI NELLE UOVA E CONFRONTO CON CEPPI UMANI

Silvia Gallina (a), Daniela Adriano (a), Tiziana Civera (b), Giacomo Fortina (c), Daniela Manila Bianchi (a), Simona Caroppo (c), Lucia Decastelli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(b) Settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi, Torino

(c) Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedale Maggiore della Carità, Novara

Salmonella risulta essere uno dei principali patogeni coinvolti in episodi tossinfettivi di origine alimentare, non solo nei paesi in via di sviluppo ma anche nei paesi industrializzati.

Sebbene la sintomatologia sia per lo più a carattere autolimitante, i costi sociali che derivano da intossicazioni alimentari rappresentano una voce importante nei bilanci degli stati coinvolti.

Tra gli alimenti maggiormente coinvolti, il comparto avicolo riveste un ruolo cardine nell'insorgenza di tossinfezioni alimentari legate alla presenza di *Salmonella* spp.; il sierotipo che più frequentemente interessa tale settore è *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*.

Analisi di caratterizzazione biomolecolare dei ceppi isolati da alimenti e da matrici umane nel corso di episodi tossinfettivi possono aiutare a delineare la situazione epidemiologica e descrivere la distribuzione accertando il coinvolgimento del patogeno.

Nel corso di questo lavoro abbiamo voluto confrontare i ceppi isolati da uova prelevate in commercio con ceppi isolati da matrici umane: i ceppi isolati sono stati analizzati mediante metodiche biomolecolari (PFGE) per effettuare un confronto dei pulsotipi.

Sono stati così confrontati 3 ceppi di *S. enteritidis* isolati da uova in commercio con 14 ceppi dello stesso sierotipo isolati da matrici umana e un ceppo di *S. Muenchen* isolato da uova con 2 ceppi umani. La caratterizzazione biomolecolare ha consentito di ottenere degli ottimi risultati per quanto attiene la verifica della correlazione tra ceppi isolati nelle uova e ceppi isolati da pazienti umani.

Per ciò che riguarda *Salmonella enteritidis* l'analisi dei pulsotipi ha consentito di evidenziare un *cluster* epidemico, con una similarità del 100% tra i ceppi isolati, costituito da un ceppo di origine avicola (uova) e 8 ceppi di origine umana. Al di fuori di questo *cluster* si collocano 3 ceppi avicoli, rappresentati da 2 uova, e 4 umani che, avendo similarità variabile tra 87,5 e 94,7% rispetto al *cluster* epidemico, sono comunque da considerare correlati ai precedenti. Per quanto attiene *Salmonella Muenchen*, invece, il confronto con i due ceppi isolati da matrice umana fa supporre che, essendoci un grado di similarità del 87% con il sierotipo isolato dalle uova, l'alimento non sia da correlarsi all'episodio tossinfettivo. I risultati ottenuti consentono di affermare che, almeno in un caso, il ceppo rilevato nelle uova sia da collegare all'episodio tossinfettivo umano.

Finanziamento Ricerca Sanitaria Finalizzata 2004 Regione Piemonte.

P16. UOVA IN COMMERCIO: PRESENZA DI SALMONELLA SPP. NELLA REGIONE PIEMONTE

Silvia Gallina (a), Daniela Adriano (a), Moshè David (b), Daniela Manila Bianchi (a), Lucia Decastelli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(b) ASL 17, Regione Piemonte, Savigliano, Cuneo

Numerosi autori riportano come *Salmonella enterica serovar Enteritidis* sia diventata, a partire dagli anni '80, il maggior agente causale di MTA in Europa e negli Stati Uniti: nel 2004, ad esempio, sono stati riportati nei paesi dell'Unione Europea 192.703 casi umani di salmonellosi. I dati forniti, però, sottostimano certamente l'entità del problema poiché molti casi di intossicazione non vengono riportati; frequentemente, infatti, i soggetti colpiti non si rivolgono al medico o a strutture ospedaliere, essendo l'infezione per lo più a carattere autolimitante. Tra gli alimenti maggiormente coinvolti in episodi tossinfettivi le uova rivestono sicuramente un ruolo predominante. *Salmonella*, infatti, può contaminare le uova nei differenti stadi della produzione mediante trasmissione verticale o orizzontale.

Sebbene il genere *Salmonella* riconosca al suo interno più di 2.400 sierotipi, quello maggiormente coinvolto nei casi di tossinfezione causata da uova ed ovoprodotti è sicuramente *S. enteritidis*. Il nostro lavoro, condotto nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Piemonte, ha valutato la presenza di *Salmonella* spp. campioni di uova prelevati in fase di commercializzazione.

Il personale dell'ASL 17 ha eseguito il prelievo di 51 campioni di uova rappresentativi delle più importanti aziende produttrici. Tali campioni sono stati analizzati presso il laboratorio Controllo Alimenti della Sede di Torino mediante tecniche microbiologiche tradizionali, seguendo quanto previsto dalla norma AFNOR V08-052/1997: la metodica prevede passaggi successivi su terreni selettivi e l'identificazione biochimica delle colonie isolate. Tutti i ceppi identificati come *Salmonella* spp., inoltre, sono stati sierotipizzati secondo quanto previsto dallo schema di *Kauffmann-White* (2001). Dei 51 campioni prelevati, 4 sono risultati positivi per *Salmonella* spp., con una positività del 2,04%. Tale dato rispecchia quanto rilevato negli anni passati nella Regione Piemonte dove le positività si assestavano intorno al 2% (2002=1,6%; 2003=2,9%; 2004=6,7%; 2005=2,1%).

In 3 campioni è stato possibile identificare il patogeno esclusivamente sul guscio; tale situazione fa presupporre una contaminazione fecale successiva alla deposizione.

In 1 campione, invece, *Salmonella* spp. è stata isolata sia dal guscio, che dal tuorlo; in questo caso, invece, si è quasi certamente in presenza di trasmissione per via orizzontale.

La sierotipizzazione, in ultimo, ha consentito di individuare tre ceppi di *S. enteritidis* ed uno *S. Muenchen*; tale dato rispecchia quanto riportato dalla bibliografia, che costantemente evidenzia il coinvolgimento di *S. enteritidis* in ambito avicolo.

Finanziamento Ricerca Sanitaria Finalizzata 2004 Regione Piemonte.

P17. UN EPISODIO DI TOSSINFEZIONE DA NOROVIRUS IN UN RISTORANTE IN PROVINCIA DI UDINE, DICEMBRE 2005

Tolinda Gallo (b,c), Ilaria Di Bartolo (d), Nancy Binkin (c), Franco Maria Ruggeri (d), Massimo Zuliani (a)

(a) *Dipartimento di Prevenzione, Azienda per i Servizi Sanitari 5 Bassa Friulana, Palmanova, Udine*

(b) *Dipartimento di Prevenzione Azienda per i Servizi Sanitari 4 Medio Friuli, Udine*

(c) *Programma di Formazione in Epidemiologia Applicata, PROFEA, Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

I *Norovirus* (NoV) sono virus enterici con genoma a RNA a polarità positiva (7.2-7.7 kb) composto da tre *open reading frame* (ORF). La ORF1 codifica per una poli-proteina non strutturale, l'ORF2 codifica per la proteina strutturale principale, presente in 90 dimeri che costituiscono il capside virale, e la ORF3, che probabilmente codifica per una proteina strutturale minore. Nell'uomo, i *Norovirus* (NoV) causano sintomatologia gastroenterica (GE) spesso associata a focolai epidemici. L'infezione da NoV ha un decorso acuto ed è autolimitante, con sintomi che, specie negli adulti, sono solo di rado sufficientemente gravi da richiedere il ricovero ospedaliero. Tuttavia, la ridottissima carica infettante e l'elevata diffusione sono in grado di scatenare epidemie anche molto vaste, per passaggio persona-persona e/o per esposizione ad alimenti (frutti di mare, vegetali e frutta), acque o ambienti contaminati con virus.

Nel dicembre 2005 è giunta al Dipartimento di Prevenzione dell'ASS Bassa Friulana la segnalazione di un aumento di casi di gastroenterite in adulti. Una prima indagine ha consentito di risalire ad una possibile fonte comune, legata al consumo di pasti in un ristorante della zona. Successivamente, è stata effettuata l'ispezione nei locali di ristorazione, nel corso della quale è stato riscontrato che 6 dei 15 alimentaristi avevano presentato sintomi gastroenterici nel corso del focolaio epidemico. A completamento dell'indagine epidemiologica è stata anche condotta un'indagine di laboratorio, su campioni di feci dei soggetti affetti, su campioni ambientali e su campioni alimentari. Quattordici campioni di feci di soggetti sintomatici tra cui commensali e personale operante nel ristorante sono stati riscontrati positivi per *Norovirus* mediante test di RT-PCR specifico per la ORF2. Nonostante alcuni alimenti (antipasti di pesce) siano risultati associati all'infezione su base epidemiologica, non è stato possibile riscontrare in essi la presenza di *Norovirus*. Al contrario un tampone ambientale relativo agli spazi cucina è risultato contaminato da *Norovirus*.

L'insieme dei risultati delle indagini epidemiologiche e delle analisi di laboratorio ha consentito di identificare un unico ceppo di *Norovirus* appartenente al genogruppo 2 quale agente eziologico responsabile dell'epidemia.

DISTRIBUZIONE DI SIEROTIPI E PULSOTIPI FRA CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* RACCOLTI NELL'AMBITO DEL PROGRAMMA “LISTERNET ITALIA” (2002-2005)

Monica Virginia Gianfranceschi, Maria Claudia D'Ottavio, Antonietta Gattuso, Paolo Aureli

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Listeria monocytogenes è un patogeno alimentare, ampiamente distribuito nell'ambiente, responsabile della listeriosi, un'infezione con un alto tasso di mortalità (20-30%) particolarmente negli individui a rischio, come gli anziani, i pazienti immunocompromessi, le donne in gravidanza, i neonati.

In questo studio abbiamo determinato i sierotipi e i profili PFGE di 674 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati in Italia, da campioni alimentari, ambientali e clinici, nel periodo 2002-2005, nell'ambito del programma “Listernet Italia”, avviato nel 2002 con lo scopo di costruire una banca dati di profili molecolari e sierotipi di ceppi di *Listeria monocytogenes*. Le strutture del SSN, che effettuano controllo ufficiale ed autocontrollo sugli alimenti, hanno inviato presso il CNQARA 326 ceppi alimentari e 59 ceppi isolati dagli ambienti di produzione e distribuzione alimentare. Altri ceppi alimentari (232) sono stati raccolti nel corso di un monitoraggio nazionale (2002-2003) su un tipo di salume italiano. Nello stesso periodo 57 isolati clinici sono stati raccolti nel corso di una sorveglianza attiva della listeriosi, condotta per ottenere maggiori informazioni su questo tipo di patologia e confrontare i dati ottenuti con quelli provenienti dalle notifiche obbligatorie, presenti nel sito del Ministero della Salute.

I dati su ceppi clinici, alimentari ed ambientali presenti nella banca dati nazionale confluiranno nella banca dati europea PulseNet, che si prefigge di individuare in tempo reale *clusters* epidemici. Scopo del presente studio è stato quello di verificare la correlazione di specifici subtipi di ceppi di *Listeria monocytogenes* con specifiche categorie alimentari e/o con casi di listeriosi. I sierotipi prevalenti individuati sono stati: 1/2c fra i ceppi alimentari (31,7%); 1/2a fra i ceppi clinici (51%) e fra i ceppi ambientali (52,5%). Rispetto a nostri dati precedenti abbiamo notato che si è verificata una inversione di tendenza dei sierotipi 1/2a e 4b fra i ceppi clinici, suggerendo che il sierotipo 1/2a sta rimpiazzando il sierotipo 4b nelle infezioni umane, come anche osservato in altri paesi europei.

Sulla base della caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Listeria monocytogenes* e la loro analisi mediante *Bionumerics*, abbiamo dimostrato che alcuni ceppi isolati da campioni alimentari ed ambientali, e alcuni ceppi isolati da campioni clinici rappresentano popolazioni sovrapponibili.

Con questo studio abbiamo voluto sottolineare l'importanza di avere a disposizione una vasta banca dati di subtipi di *Listeria monocytogenes*, provenienti da una ampia varietà di campioni, che possa essere in grado di predire rapidamente il veicolo più probabile nel corso di una epidemia di listeriosi.

P18. EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA* SIEROTIPO *ENTERITIDIS* ISOLATE IN PUGLIA

Maria Nicola Giasi, Marilina Santantonio, Lorenzo Dell'Aquila, Caterina Rizzo, Maria Franca Coscia, Angelo Fortunato, Danila De Vito, Giovanni Rizzo

Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni, Enter-net Puglia, Bari

Nell'ambito delle attività del Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni, Enter-net Puglia che raccoglie i ceppi isolati nei Laboratori periferici della regione dal 1996, è stata avviata un'attività di sorveglianza molecolare dei ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo *Enteritidis* il sierotipo più frequentemente isolato in Puglia negli ultimi anni. Oggetto di studio è stato un campione rappresentativo di 72 ceppi pervenuti al Centro di Riferimento nel corso degli anni, dal 2002 al 2005. I ceppi, sono stati sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato (PFGE). La PFGE essendo altamente discriminante e capace di suddividere gli isolati batterici in sottotipi è una valida base di partenza per la sorveglianza e l'indagine di epidemie nella popolazione. Obiettivo dello studio è stato quello di verificare la distribuzione dei diversi pulsotipi per provincia di isolamento e l'eventuale presenza di pattern simili o diversi.

I 72 ceppi, tutti pervenuti al laboratorio di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni, Enter-net Puglia, sono stati campionati casualmente attraverso una estrazione random dal database regionale (Access 2003) che raccoglie tutte le schede epidemiologiche e microbiologiche degli isolati.

Tali ceppi dopo identificazione biochimica, antibiogramma e sierotipizzazione, sono stati sottoposti a PFGE. È stato utilizzato l'enzima di restrizione *XbaI*, in accordo con il protocollo standardizzato nell'ambito del progetto Salm-gene.

Dei 72 ceppi selezionati, 10 erano del 2002, 17 del 2003, 21 del 2004 e 24 del 2005. Il campione era rappresentato per il 54% da soggetti di sesso maschile, e la fascia d'età prevalente era quella compresa tra 0 e 15 anni. La PFGE ha permesso di risolvere i macro frammenti di restrizione, da 13 a 16 bande comprese tra 40 e 600 Kb.

I pattern elettroforetici generati sono risultati essere identici tra di loro tranne che in alcuni casi. La distribuzione dei diversi pulsotipi per provincia di isolamento ha permesso di dimostrare che il pattern più frequente in Puglia è rappresentato dal tipo 1 (84,72%) ed è equamente distribuito in tutte le province regionali così come il tipo 3 (8,33%). Il pattern 2 è risultato provenire solo dalla provincia di Foggia (4,2%), mentre i restanti pulsotipi dalla provincia di Bari (1,39%).

Risulta evidente come attualmente, per approfondire il ruolo patogeno ed epidemiologico dei ceppi isolati, e attuare le appropriate strategie di intervento e di sorveglianza, non ci si debba fermare alla sierotipizzazione, né alla tipizzazione fagica, ma è necessaria quella molecolare, che vede nella PFGE un'utile tecnica per implementare la sorveglianza epidemiologica e le indagini epidemiologiche di campo in caso di epidemia.

RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI IN CEPPI DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ISOLATI DA INFEZIONI UMANE E DA FONTI ANIMALI NEGLI ANNI 2002-2006

Caterina Graziani (a), Luca Busani (a,b), Antonia Ricci (b), Marzia Mancin (b), Claudia Lucarelli (a), Slawomir Owczarek (a), Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Salmonella typhimurium (STM) è un sierotipo ubiquitario, comunemente isolato dagli animali, dagli alimenti di origine animale e dall'ambiente. A partire dal 2001, STM è il sierotipo più frequente nelle infezioni umane in Italia e la sua importanza in Sanità Pubblica è aumentata a causa della elevata frequenza di resistenza multipla agli antibiotici.

In questo studio sono riportate le frequenze di resistenza in ceppi di STM di origine umana ed animale raccolti dalle reti di sorveglianza Enter-net ed Enter-vet nel periodo 2002-2006. I test di sensibilità agli antibiotici sono stati effettuati presso i laboratori di riferimento (Istituto Superiore di Sanità, Roma e Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova) usando i metodi standard.

Negli isolati umani, la frequenza di multiresistenza (resistenza a 4 o più antibiotici) variava tra il 62,4% nel 2002 e il 71% nel 2006. Negli isolati di origine animale la frequenza di multiresistenza andava dal 63% nel 2004 al 20,7% nel 2005. L'analisi dei profili di resistenza negli isolati di origine umana ha mostrato negli ultimi anni un aumento della diffusione di isolati con resistenza ad ampicillina (A), streptomina (S), sulfonamidi (Su), tetraciclina (T), che sono attualmente più frequenti di quelli con il profilo ACSSuT (resistenza aggiuntiva al cloramfenicolo, C), tipicamente associato al fagotipo DT104.

Gli isolati con profilo ASSuT risultavano spesso non fago-tipizzabili (NT) e hanno raggiunto nel 2006 una frequenza del 28,8%, rispetto al 21,6% di quelli con profilo ACSSuT. Frequente il riscontro di resistenze aggiuntive a questi profili, in particolare all'acido nalidixico e al trimetoprim/sulfametossazolo. Questi profili con resistenze aggiuntive sono aumentati negli anni, in particolare negli isolati di origine animale. Sia nei ceppi di origine umana che animale risulta ancora rara la resistenza ai fluorochinoloni e alle cefalosporine di III generazione. In conclusione, i risultati di questo studio confermano che particolari cloni di *S. typhimurium* presenti nell'uomo e negli animali possono essere caratterizzati da particolari profili di resistenza agli antibiotici.

La sorveglianza integrata della resistenza in ambito medico e veterinario può consentire di identificare resistenze e multiresistenze emergenti e fornire indicazioni sulla fonte animale delle salmonellosi umane.

P19. PRESENZA DI GENI DI VIRULENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* DI ORIGINE UMANA E AVIARIA RESISTENTI E SENSIBILI ALLA CIPROFLOXACINA

Caterina Graziani (a), Marina Cerquetti (a), Gabriella Parisi (b), Fiorella Tomei (c), Alessandro Fioravanti (a), Rosangela Tozzoli (a), Michela Corrò (d), Antonio Battisti (e), Stefano Morabito (a), Ida Luzzi (a), Alfredo Caprioli (a)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma

(c) Laboratorio Analisi BIOS, Roma

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

La resistenza ai fluorochinoloni rappresenta un problema emergente nelle infezioni extraintestinali causate da *Escherichia coli* nell'uomo. Questa resistenza è anche particolarmente frequente tra i ceppi di *E. coli* isolati da specie avicole allevate in modo intensivo, dove questi antibiotici sono utilizzati con elevata frequenza. Ciò ha portato a formulare l'ipotesi che ceppi di *E. coli* ciprofloxacina-resistenti di origine aviaria possano essere acquisiti dall'uomo attraverso gli alimenti. Per sondare questa ipotesi, 125 ceppi di *E. coli* isolati da infezioni extraintestinali umane resistenti (64) e sensibili (61) alla ciprofloxacina e 113 d'origine aviaria, isolati da casi di colibacillosi (74) e da animali regolarmente macellati (39), sono stati esaminati mediante PCR per evidenziare la presenza di geni di virulenza comunemente associati a ceppi di origine aviaria (*traT*, *iss*, *iroN*, *cvaC*, *ireA*, *iutA*, *iucD*, *tsh*) e umana (*cnf* e *cdt*).

I dati sono stati analizzati comparando la distribuzione dei diversi geni di virulenza nei ceppi d'origine umana e aviaria, sensibili e resistenti alla ciprofloxacina. Tra gli *E. coli* di origine umana, alcuni geni di virulenza erano significativamente più frequenti tra i ceppi sensibili alla ciprofloxacina: *CNF* (33% vs 0), *ireA* (25% vs 6%), *iroN* (34% vs 9%). I geni *iucD* (80% vs 43%) e *iutA* (84% vs 49%) erano invece significativamente più frequenti tra i ceppi resistenti. Due associazioni di geni di virulenza erano significativamente più frequenti tra i ceppi resistenti alla ciprofloxacina: *traT-iucD-iutA* (44% vs 10%) e *iucD-iutA* (22% vs 3%). Tra i ceppi sensibili è stata invece rilevata una maggiore dispersione dei profili genici, il più frequente dei quali risultava *traT-iucD-iutA*, presente solo nel 10% dei ceppi. Tra i ceppi di origine aviaria è stata riscontrata un'elevata dispersione dei profili genici, tra cui il più frequente, *traT-iucD-iutA-cvaC-iroN-iss-tsh*, era presente solo nel 12% dei ceppi. Inoltre, nessuno dei singoli geni e dei profili genici risultava significativamente associato ai ceppi isolati da colibacillosi. Solo uno dei ceppi aviari possedeva il gene *cnf*.

I primi risultati di questo studio indicano che: i) il 65% dei ceppi umani resistenti alla ciprofloxacina presentavano due profili genici, raramente (13%) riscontrati tra i ceppi sensibili; ii) questi profili genici non risultavano frequenti tra i ceppi di origine aviaria, i quali presentavano una accentuata dispersione di profili; iii) il gene *cnf* è stato riscontrato nei ceppi umani sensibili ma non in quelli resistenti e in un solo ceppo di origine aviaria.

In conclusione questi risultati non sembrano supportare l'ipotesi di una trasmissione di ceppi aviari resistenti alla ciprofloxacina all'uomo.

P20. GENI DI VIRULENZA E RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA POLLI E TACCHINI CON COLIBACILLOSI E REGOLARMENTE MACELLATI

Caterina Graziani (a), Rosa Fioravanti (a), Rosangela Tozzoli (a), Michela Corrà (b),
Alfredo Caprioli (a), Stefano Morabito (a)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Escherichia coli pur facendo parte della normale microflora dell'intestino dell'uomo e degli animali, rappresenta, tuttavia, una frequente causa di patologie intestinali ed extraintestinali. Nelle specie avicole, la colibacillosi causata dai cosiddetti *avian pathogenic E. coli* (APEC) è una delle principali cause di mortalità con danni economici rilevanti per gli allevatori. Agli APEC sono stati associati diversi fattori di virulenza e, negli anni, si è evidenziato anche un aumento delle resistenze agli antibiotici. Scopo di questo lavoro è stato l'analisi dei geni di virulenza e delle resistenze agli antibiotici in una collezione di isolati provenienti da episodi di colibacillosi in polli e tacchini e dal contenuto intestinale di soggetti delle stesse specie regolarmente macellati.

Complessivamente, 248 ceppi isolati da pollo e 207 da tacchino sono stati sottoposti al saggio di sensibilità agli antibiotici mediante diffusione in agar e ad analisi con PCR per evidenziare la presenza di geni associati agli APEC, quali *traT*, *iss*, *iroN*, *cvaC*, *iucD*, *tsh* e altri geni associati alla virulenza in altri gruppi di *E. coli* patogeni: *eae*, *Agg*, *cnf* e *cdt*. I geni di virulenza *traT*, *iss*, *iroN*, *cvaC*, e *tsh* sono stati riscontrati con frequenze elevate sia negli isolati da colibacillosi che in quelli da animali regolarmente macellati, indipendentemente dalla specie.

Tra gli isolati da tacchino, il gene *iucD* era più frequente nei ceppi da colibacillosi rispetto a quelli da soggetti sani. I geni *cvaC*, *iss* e *iucD* risultavano complessivamente più frequenti negli isolati da pollo che in quelli da tacchino. Il gene *eae*, tipico di *E. coli* enteropatogeni (EPEC) capaci di indurre lesioni del tipo *attaching and effacing*, è stato identificato in 23 ceppi da pollo e 5 da tacchino, tutti isolati da animali regolarmente macellati.

Per quanto riguarda la sensibilità agli antibiotici, nei ceppi batterici isolati da entrambe le specie sono state riscontrate frequenze di resistenza molto elevate per tetraciclina (76,6%), ampicillina (63,6%), sulfonamidi (56,9%), acido nalidixico (49,2%), streptomina (40,9%) e trimetoprim/sulfametossazolo (34,3%). Al contrario, nessun isolato era resistente al cefotaxime. La resistenza a trimetoprim/sulfametossazolo (43% vs 27%), tetraciclina (93% vs 63%), ampicillina (68% vs 59%), streptomina (48% vs 34%) e sulfonamidi (68% vs 47%) era significativamente più elevata tra i ceppi da tacchino che in quelli da pollo. I ceppi isolati da colibacillosi mostravano frequenze di resistenza a enrofloxacin (42% vs 11%), acido nalidixico (60% vs 47%) e

trimethoprim/sulfametossazolo (57% vs 29%) significativamente più elevate rispetto ai ceppi isolati da animali regolarmente macellati.

I risultati finora ottenuti: i) non permettono di evidenziare un particolare profilo di geni di virulenza nei ceppi isolati da colibacillosi; ii) confermano un'elevata frequenza di resistenza agli antibiotici nei ceppi di *E. coli* delle specie avicole allevate.

P21. VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI SNPS MEDIANTE *REAL-TIME* PCR PER L'INDIVIDUAZIONE DEI COMPLESSI CLONALI DI APPARTENENZA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATI DA ALIMENTI ED ANIMALI

Annalisa Leone, Giancarlo Ripabelli, Incoronata Fanelli, Michela Lucia Sammarco, Guido Maria Grasso

Cattedra di Igiene, Dipartimento di Scienze per la Salute, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi del Molise, Campobasso

I dati MLST (*Multilocus Sequence Typing*) consentono di definire diversi complessi clonali di *C. jejuni* identificabili dalla presenza di alleli comuni a differenti isolati, contenenti *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs), rappresentativi del profilo allelico. La ricerca di SNPs mediante *real-time* PCR può essere considerata una strategia supplementare alla genotipizzazione basata su MLST, consentendo una identificazione preliminare del complesso clonale di appartenenza degli isolati.

In questo studio sono stati analizzati 32 ceppi di *C. jejuni* isolati da carne (11 pollo, 6 tacchino, 7 suino, 8 bovino) e 33 da animali (1 bovino, 32 polli) mediante *real-time* PCR basata su sonde Taqman MGB per identificare gli SNPs nei 2 alleli che, secondo i dati di MLST, mostrano maggiore frequenza in un complesso. È stata valutata l'appartenenza dei ceppi a 4 complessi clonali correlati a differenti ospiti: St-21 (umani, pollame, ovini, bovini); St-257 e St-45, (umani e pollame); St-61 (ovini, bovini e umani). Gli alleli ed i rispettivi polimorfismi ricercati in ciascun complesso clonale sono stati: St-21, *glnA1* 108, *glnA1* 267, *tkt-1* 330; St-45, *gltA10* 201, *gltA10* 225, *tkt-7* 138; St-257, *glyA62* 483, *pgm4* 163; St-61, *glnA4* 18, *glnA4* 220, *uncA17* 336.

Considerando l'allele maggiormente espresso, gli isolati animali sono stati correttamente raggruppati in St-21, St-45 e St-257 ad eccezione dell'isolato bovino che doveva essere rilevato solo in St-21. Pochi ceppi sono stati collocati in St-61 ed inaspettatamente l'unico isolato bovino non vi è stato incluso. I campioni alimentari sono stati raggruppati tutti nei complessi St-21 e St-257, in gran parte in St-45 e pochi in St-61. Anche in questo caso il raggruppamento ha poco correlato le fonti di isolamento con il rispettivo complesso in quanto isolati suini e bovini sono stati rilevati in complessi non specifici. Valutando anche gli alleli espressi in percentuali più basse, molti isolati da pollo sono stati collocati in St-21 e St-45, includendovi nuovamente anche il ceppo bovino. Invece, in St-257 e St-61 gli isolati individuati corrispondevano solo al pollame, non contemplato in quest'ultimo complesso.

In St-21 tra i ceppi alimentari sono stati rilevati soprattutto pollo ed inaspettatamente suino; in maniera ugualmente inattesa in St-45 sono stati riuniti maggiormente isolati di suino, bovino e pollo, quest'ultimo unica tipologia prevista. Infine, in St-61 sono stati rilevati soprattutto isolati da bovino, pollo e tacchino, sebbene sarebbe dovuto essere incluso solo il ceppo isolato da carne bovina. Tali incongruenze tra serbatoio e complesso clonale può essere in parte spiegata dal fatto che gli isolati di origine non umana

contengono numerosi e differenti profili allelici inusuali non ancora assegnati ad uno specifico complesso clonale. Infatti sono costantemente in aumento nei database gli isolati ed i rispettivi alleli sequenziati, rendendo plausibile che gli SNPs considerati in questo lavoro potrebbero non essere perfettamente idonei per una corretta caratterizzazione degli isolati. È pertanto necessario approfondire lo studio di nuovi SNPs per discriminare i vari tipi di isolati riunendoli in specifici complessi, utili per comprendere meglio le fonti di trasmissione del microrganismo e favorire una diagnosi tempestiva.

P22. EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI *CAMPYLOBACTER* SPP.: CONFRONTO TRA PFGE ED ERIC-PCR

Annalisa Leone, Mariana Rotili, Incoronata Fanelli, Michela Lucia Sammarco, Giancarlo Ripabelli

Cattedra di Igiene, Dipartimento di Scienze per la Salute, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi del Molise, Campobasso

La capacità di *Campylobacter* spp. di colonizzare l'intestino di diversi animali e il rischio di contaminazione crociata durante la preparazione degli alimenti può essere all'origine di enteriti nell'uomo. Tali caratteristiche spesso rendono difficile l'individuazione della sorgente di infezione. I metodi tradizionali di tipizzazione mostrano alcuni limiti nella caratterizzazione del microrganismo, ostacoli che possono essere superati mediante l'applicazione di tecniche molecolari altamente discriminanti quali *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) ed *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence* PCR (ERIC-PCR).

Lo scopo della ricerca è stato quello di confrontare la PFGE, effettuata con l'enzima di restrizione *KpnI*, e l'ERIC-PCR per lo studio dell'epidemiologia molecolare di 28 ceppi di *C. jejuni* e 31 di *C. coli* isolati da casi umani, alimenti ed animali, provenienti dal nord Italia. I profili molecolari sono stati analizzati con il software Bionumerics, utilizzando il coefficiente di correlazione di DICE e ottimizzazione e tolleranza all'1%. L'analisi dei *cluster*, considerati ad una similarità del 70%, è stata effettuata mediante *Unweighted Pair Group Method* (UPGMA). La valutazione è stata compiuta sia nell'ambito delle singole specie, sia per le due specie combinate.

La PFGE effettuata su *C. jejuni* ha generato 4 gruppi eterogenei che includevano isolati di origine umana insieme a quelli di provenienza animale e alimentare, rispetto ai 9 *cluster* formati dall'ERIC-PCR, risultati, però, più omogenei. I 31 ceppi di *C. coli* sono stati raggruppati, dalla PFGE, in 3 *cluster* contro i 6 generati dall'ERIC-PCR; in questo caso la composizione dei gruppi è risultata più omogenea per la prima metodica e meno omogenea per la seconda. Per quanto concerne l'esame dei dendrogrammi generati dall'analisi simultanea dei profili prodotti da entrambe le specie, sia la PFGE sia l'ERIC-PCR sono state in grado di discriminare tra *C. jejuni* e *C. coli*, raggruppandoli in *cluster* ben distinti, fatta eccezione per pochi ceppi che hanno clusterizzato in maniera errata. La capacità di discriminazione delle due metodiche è stata valutata mediante l'indice di Simpson, che ha fornito valori elevati e praticamente sovrapponibili per entrambe le tecniche: 0,9988 per la PFGE e 0,9982 l'ERIC-PCR. La PFGE, sebbene più laboriosa e costosa, ha mostrato una migliore risoluzione e visualizzazione delle bande, favorendo l'interpretazione dei dati in maniera inequivocabile e mostrando una migliore concordanza con tutte le informazioni epidemiologiche in nostro possesso.

La composizione eterogenea dei *cluster*, in particolare quelli generati dalla PFGE, suggerisce come gli alimenti di origine animale e gli animali stessi, siano, dal punto di vista epidemiologico, una importante fonte di infezione per l'uomo. Infine, la minore

rispondenza dell'ERIC-PCR in termini di chiarezza e concordanza dei risultati potrebbe essere stata influenzata in maniera significativa dalla struttura geneticamente instabile di *Campylobacter* spp., che continuamente tende ad adattarsi alle esigenze di colonizzazione di differenti specie animali, contribuendo, così, alla difficile interpretazione epidemiologica delle infezioni.

P23. ESCHERICHIA COLI O26 IN CARNE MACINATA COMMERCIALIZZATA AL DETTAGLIO

Vanessa Lorusso (a), Angela Dambrosio (a), Nicoletta Cristiana Quaglia (a), Antonio Parisi (b),
Giovanna La Salandra (b), Giovanni Normanno (a), Gaetano Vitale Celano (a)

(a) *Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Valenzano, Bari*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia*

Escherichia coli verocitotossici (VTEC) non-O157 rappresentano un importante gruppo di microrganismi patogeni emergenti che possono causare infezioni a veicolo alimentare. In particolare, il sierogruppo O26 è responsabile di malattie enteriche ed extraintestinali come la Sindrome Emolitica Uremica (SEU). In virtù della presenza di serbatoi animali, primi tra tutti i ruminanti, questi microrganismi possono rinvenirsi negli alimenti derivati: la carne cruda di bovino è spesso responsabile di epidemie. In questa indagine, 200 campioni di carne tritata bovina acquistata al dettaglio sono stati analizzati per rilevare la presenza di *Escherichia coli* O26. Successivamente, i ceppi isolati sono stati studiati per valutarne la capacità verocitotossica e le proprietà antimicrobiche. *E. coli* O26 è stato isolato in tre campioni (1,5%); i ceppi analizzati sono risultati negativi al test di verocitotossicità e hanno mostrato proprietà antimicrobiche nei confronti di almeno quattro molecole testate. Due ceppi sono risultati *Multi-Drug Resistant* (MDR). Nonostante i ceppi isolati non siano risultati verocitoproduttori, la presenza di *E. coli* O26 nella carne macinata bovina evidenzia la necessità di migliorare le condizioni igieniche di processo in modo da ridurre sia il rischio di contrarre malattie alimentari sia il rischio di trasmissione di organismi MDR attraverso il consumo di alimenti.

RIBOTIPIZZAZIONE DEI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ASSOCIATI A MATRICI ALIMENTARI: UNO STRUMENTO AL SERVIZIO DELLA EPIDEMIOLOGIA

Marina Nadia Losio, Barbara Bertasi, Michela Tilola, Cristina Panteghini, Nadia Zanardini, Paolo Daminelli, Paolo Boni

Dipartimento Alimenti e Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

Nonostante da parte di alcuni autori si ritenga che le popolazioni di *L. monocytogenes* siano da considerarsi clonali, tuttavia l'attribuzione di un isolato ad una determinata linea genetica assume importanza per l'assegnazione di un possibile livello di patogenicità, per implicazione in ordine alla tracciabilità del patogeno negli ambienti e all'interno dei cicli produttivi ma anche nei link epidemiologici, spesso carenti di informazioni. La caratterizzazione molecolare mediante ribotipizzazione consente di correlare direttamente i sierotipi con le linee genetiche e, quindi, di stimare il potenziale patogeno degli isolati. Nell'ambito quindi della valutazione del rischio associato a specifiche matrici alimentari la conoscenza degli specifici genotipi consente di valutare il possibile rischio ed anche di identificare le possibili fonti di contaminazione.

Più specificatamente i risultati della ribotipizzazione possono rivelare le modalità di transfert alimento-uomo ma anche, entro gli stabilimenti e lungo la catena alimentare, consentono di individuare le modalità di ingresso, permanenza, diffusione del patogeno. Su questa base, obiettivo del presente lavoro è stato la ribotipizzazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* al fine di caratterizzarne epidemiologicamente ingresso, permanenza, diffusione entro gli ambienti di lavorazione/manipolazione di alimenti stimandone anche la correlazione con i 3 *lineage* entro i quali vengono classificati tutti gli isolati.

Nell'ambito di 100 stabilimenti di produzione di 2 prodotti DOP sono stati eseguiti 2.000 tamponi ambientali e raccolti 100 campioni di croste di forme a fine stagionatura; sono state quindi eseguite indagini molecolari e microbiologiche finalizzate alla ricerca di *L. monocytogenes*. I 97 campioni ambientali e le 50 croste di formaggio positive all'esame microbiologico sono stati sottoposti a ribotipizzazione automatica. I risultati hanno permesso di evidenziare come il 50% degli isolati appartenessero al ribotipo DUP 1045, correlato al *lineage* II che contiene solo ceppi isolati da episodi sporadici dell'uomo, il 15% appartenesse al DUP 1042 correlato al *lineage* I che comprende ceppi isolati da episodi sporadici e tutti i ceppi isolati da casi epidemici, il 25% al DUP 1038, anch'esso associato al *lineage* I mentre solo il rimanente 10% risultasse compreso nel DUP 1032 e DUP 1033, correlati al *lineage* III che non comprende nessun ceppo isolato dall'uomo. Tutti i ceppi isolati dalle croste sono risultati correlabili, sia per ribotipo che ribogruppo, a ceppi isolati negli stabilimenti di produzione.

I risultati ottenuti consentono quindi di confermare come la ribotipizzazione automatica possa essere utilmente impiegata nell'applicazione di piani di sorveglianza epidemiologica essendo in grado non solo di determinare correlazioni specifiche tra i ceppi isolati ma anche di dare utili informazioni sul rischio ad essi associato.

P24. SALMONELLA ENTERICA SIEROTIPO TYPHIMURIUM: UN NUOVO CLONE MULTIRESISTENTE EMERGENTE IN ITALIA

Claudia Lucarelli (a), Caterina Graziani (a), Luca Busani (a,c), Anna Maria Dionisi (b), Slawomir Owczarek (b), Laura Villa (b), Antonia Ricci (c), Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (b)
(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Il fenomeno della resistenza multipla agli antibiotici in *Salmonella* rappresenta un importante problema di sanità pubblica. In Italia negli ultimi anni è stato registrato un marcato aumento nel numero di isolamenti di *S. typhimurium* (STM) con un particolare profilo di resistenza a quattro antibiotici: ampicillina, streptomina, sulfonamidi, tetraciclina (ASSuT). Questo profilo, che attualmente rappresenta il 35,5% degli stiptipi multiresistenti, è caratterizzato dall'assenza di resistenza al cloranfenicolo carattere distintivo del clone DT104 ACSSuT ampiamente diffuso in tutto il mondo.

Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare ceppi di STM con profilo ASSuT al fine di valutarne la possibile origine clonale.

Un campione di 300 ceppi di STM con profilo ASSuT isolati nel periodo 2003-2005 sono stati fagotipizzati e sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Su un campione di 10 ceppi non correlati epidemiologicamente è stata eseguita tipizzazione molecolare mediante VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) e su 30 ceppi è stata eseguita PCR per l'identificazione dei geni di resistenza.

La maggior parte dei ceppi è risultata non tipizzabile (NT) con il pannello standard di fagi. L'analisi dei profili in PFGE ha mostrato come oltre il 60% degli isolati presenti un identico profilo classificato come XB0079 nel database europeo Salm-gene.

L'analisi dei ceppi mediante VNTR ha mostrato un maggior potere discriminante rispetto alla PFGE, individuando profili diversi all'interno del pulsotipo XB0079. Tale eterogeneità può essere spiegata dal fatto che i ceppi sono epidemiologicamente non correlati e possono aver acquisito mutazioni a seguito della diversa pressione selettiva a cui sono stati sottoposti.

Tutti i ceppi analizzati mediante PCR per i determinanti di resistenza, presentavano i seguenti geni: *bla_{TEM}* per la resistenza all'ampicillina, *strA-strB* per la resistenza alla streptomina, *sul2* per la resistenza ai sulfamidici e *tetB* per la resistenza alla tetraciclina. Questi geni di resistenza sono tutti molto comuni in *Salmonella*, con l'eccezione di *tetB*, la cui presenza sembra essere particolarmente associata agli isolati con profilo ASSuT.

In conclusione i risultati di questo studio indicano che gli stiptipi di *S. typhimurium* con profilo ASSuT, sebbene di fagotipi diversi, appartengono in maggioranza ad uno stesso clone batterico caratterizzato da: profilo di PFGE XB0079 e da una regione di resistenza diversa da quella di DT104.

P25. EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI ROTAVIRUS UMANI CIRCOLANTI A PARMA NEL PERIODO 2004-2005

Maria Cristina Medici (a), Laura Anna Abelli (a), Vito Martella (b), Monica Martinelli (a),
Canio Buonavoglia (b), Giuseppe Dettori (a), Carlo Chezzi (a)

(a) *Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Università degli Studi, Parma*

(b) *Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Università degli Studi, Bari*

Nell'uomo l'infezione da *rotavirus* di gruppo A (GARV) è considerata la principale causa di enterite nei primi anni di vita e vaccini per la prevenzione dell'enterite da *rotavirus* sono in fase di commercializzazione. In Italia è possibile stimare l'impatto di questa patologia nei bambini di età <5 anni in più di 80.000 visite mediche, 10.000 ricoveri e 11 decessi ogni anno. Il genoma dei *rotavirus* è costituito da 11 segmenti di RNA bicatenario che possono essere visualizzati mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide (elettroferotipo o e-tipo). I GARV sono classificabili in G- e P-tipi sulla base delle proteine VP7 e VP4. Sulla base della proteina VP6, i GARV sono classificati in sottogruppi (SG) I e II. Sono noti 16 G tipi e 27 P tipi. Gli stipti di *rotavirus* umani P[8], G1, G3, G4 e G9 hanno e-tipo lungo e SGII, mentre gli stipti P[4]G2 hanno SGI ed e-tipo corto. Oggetto di questo studio è stato la caratterizzazione molecolare dei ceppi GARV associati a casi di diarrea acuta infantile a Parma nel periodo 2004-2005. Sono stati esaminati al microscopio elettronico 857 campioni di feci. Di questi 274 contenevano particelle *rotavirus*-simili (prevalenza del 32%). L'elettroforesi in gel di poliacrilamide e/o un saggio di agglutinazione al lattice hanno confermato la presenza di GARV in 270 campioni, mentre hanno rivelato in 2 casi la presenza di *rotavirus* di gruppo C e in un caso un'infezione mista *reovirus*-GARV. L'analisi filogenetica dei geni VP4, VP6 e VP7 dei 2 stipti di *rotavirus* di gruppo C ha dimostrato la loro origine umana. Mediante genotipizzazione in nested RT-PCR dei 271 stipti GARV, la maggior parte sono stati caratterizzati come P[8]G1 (42,8%) e P[8]G9 (29,9%). I virus P[8]G1 sono stati prevalenti nel 2004 (67,5%), mentre i virus P[8]G9 hanno predominato nel 2005 (41,5%). Inoltre sono stati identificati un ceppo P[8]G1+G2, e-tipo lungo, ed un virus P[14]G8, e-tipo lungo. Sebbene le fluttuazioni dei P- e G-tipi di HRV rientrino nelle caratteristiche dell'epidemiologia molecolare di questi virus, la sorveglianza dei genotipi circolanti ha un significato importante sia nel definire il quadro epidemiologico molecolare sia nell'individuare l'eventuale emergenza di genotipi nuovi o rari che potrebbero sfuggire alla protezione indotta dai vaccini in quanto antigenicamente differenti. La sorveglianza epidemiologica è fondamentale per valutare l'efficacia dei vaccini e per valutare la necessità di eventuali future implementazioni dei vaccini stessi.

TIPIZZAZIONE MEDIANTE RIBOPRINTING DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA ALIMENTI *READY TO EAT*

Domenico Meloni (a), Anna Mureddu (a), Francesca Piras (a), Maria Maddalena Colleo (a),
Rina Mazzette (a), Mansel W. Griffiths (b)

(a) *Dipartimento di Biologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli
Studi, Sassari*

(b) *Canadian Research Institute for Food Safety-Guelph, Ontario, CA*

L'applicazione delle tecniche di ribotipizzazione presenta notevole interesse ai fini dell'individuazione dei sottotipi di *L. monocytogenes* (*L.m.*) cui viene riconosciuta una maggiore patogenicità per l'uomo. L'elevato potere discriminatorio della ribotipizzazione è legato all'analisi dell'RNA ribosomiale (rRNA), che si presenta ben conservato e costituisce circa l'82% dell'RNA totale batterico. Gli operoni per gli rRNA possono inoltre essere presenti in copie multiple, rendendo la tecnica più discriminante. Nel presente lavoro sono stati sottoposti a caratterizzazione e tipizzazione n. 42 ceppi di *L.m.* isolati in prodotti del commercio *ready to eat*. Lo scopo era l'individuazione dei biotipi maggiormente diffusi e di cloni cellulari caratterizzati da maggiore patogenicità per l'uomo. I ceppi sono stati isolati da: a) prodotti della pesca (n. 26); b) prodotti a base di carne (n. 15); prodotti vegetali di IV gamma (n. 1). L'identificazione molecolare degli isolati è stata condotta mediante amplificazione del gene *prfA* e la sierotipizzazione mediante determinazione degli antigeni O ed H. Tutti i ceppi sono stati ribotipizzati con l'enzima di restrizione *EcoRI*, mediante il *RiboPrinter® Microbial Characterization System (DuPont-Qualicon, Wilmington, DE)*. I profili di restrizione sono stati analizzati e confrontati con quelli presenti nella *DuPont Identification library*. Sulla base dell'analisi dei risultati della tipizzazione è stata inoltre valutata l'appartenenza dei ceppi di *L.m.* alle 3 linee genetiche (*lineages* I, II, III) descritte in bibliografia. L'utilizzo dell'enzima di restrizione *EcoRI* (soglia di similarità >0,86) ha permesso di confermare (100%) l'identificazione di specie ottenuta mediante amplificazione del gene *prfA*. I 42 ceppi esaminati sono stati suddivisi in 16 distinti ribogruppi (soglia di similarità >93%), a loro volta classificati in 17 differenti cloni DUP-IDs. Il 65% dei ceppi di *L.m.* ricadevano nel *lineage* I, comprendente sottotipi cui viene riconosciuta una maggiore patogenicità per l'uomo. A questa linea genetica appartenevano, oltre ai ceppi di sierotipo 3b, i sierotipi 1/2b, 4b e 4e, compresi in due distinti gruppi clonali, DUP-ID 1038 e 1042, associati in passato a casi di Listeriosi alimentare epidemica. In particolare il clone cellulare DUP-ID 1038, ritenuto di recente evoluzione, avrebbe sviluppato un elevato potenziale patogeno nei confronti dell'uomo ed una spiccata abilità di sopravvivere e moltiplicarsi in un'ampia gamma di alimenti. Il restante 35% dei ceppi di *L.m.*, comprendente i sierotipi 1/2a ed 1/2c, ricadeva nel *lineage* II, nel quale sono inclusi sottotipi responsabili di forme sporadiche di Listeriosi alimentare. Nessuno dei ceppi apparteneva al *lineage* III. I risultati della ribotipizzazione hanno fornito elementi utili all'indagine epidemiologica e allo studio di clonalità dei ceppi di *L.m.* isolati da alimenti.

P26. UNA EPIDEMIA DI SALMONELLOSI DURANTE UNA “RUSTUTA” TRA AMICI IN UNA MASSERIA NELLE CAMPAGNE RAGUSANE

Gaetano Migliorino (a), Claudio Calogero Pace (a), Giuseppe Ferrera (a), Adriana Pavia (b), Francesco Blangiardi (a)

(a) *Osservatorio Epidemiologico Aziendale (OEA), Servizio di Epidemiologia, Dipartimento di Prevenzione AUSL 7 Ragusa*

(b) *Laboratorio di Sanità Pubblica, AUSL 7 Ragusa*

All'OEA dell'AUSL 7 di Ragusa è stato notificato il 7/02/07 un caso di Salmonellosi del gruppo D dal reparto di Malattie Infettive dell'Ospedale di Ragusa, riferito ad un adulto di 49 anni. Invitato il paziente c/o l'ufficio dell'OEA, questi riferiva di aver partecipato il 28/01/07 ad un banchetto tra amici e il giorno successivo aveva manifestato febbre (39°C), diarrea \geq di tre scariche, dolori addominali e vomito; motivo per cui era ricorso alle cure ospedaliere. Inoltre lo stesso riferiva di altre persone partecipanti al banchetto che avevano accusato gli stessi sintomi. Nel frattempo all'OEA veniva segnalato un altro ricovero per salmonellosi del gruppo D; caso relativo ad una bambina di 8 anni, appartenente al gruppo del banchetto. È stato approntato un elenco di tutti i componenti del banchetto con i numeri telefonici.

L'OEA ha realizzato uno studio di coorte retrospettivo producendo un apposito questionario standardizzato somministrato tramite intervista telefonica l'8/02/07 a tutti i partecipanti alla “rustuta” (alimenti cotti alla brace). Il questionario richiedeva i dati anagrafici (età, sesso, ecc.), i sintomi (quali, l'ora e le modalità di comparsa), gli alimenti consumati (la loro composizione, chi l'aveva manipolato e dove erano stati acquistati) e le terapie con antibiotici e/o le patologie di tipo gastroenterico dei giorni precedenti. Sono state intervistate 32 persone.

La definizione di caso probabile: persona che ha partecipato al banchetto, e che dopo >6 ore dal pasto ha manifestato: diarrea, febbre a 38,5°C, con o senza dolori addominale e vomito. L'inclusione prevedeva che la sintomatologia non fosse già stata manifestata precedentemente e che i conviviali non fossero stati sottoposti a terapia antibiotica, nei giorni precedenti.

Il laboratorio di Sanità Pubblica dell'AUSL 7 di Ragusa riferiva all'OEA che l'Istituto Zooprofilattico Provinciale aveva analizzato le uova utilizzate per la preparazione di alcune pietanze del banchetto sopradescritto, in quanto alcuni conviviali avevano richiesto di sottoporli ad analisi batteriologica.

Dall'analisi dei gusci delle uova si rilevava la presenza di *Salmonella* del tipo *enteritidis*.

Da successive telefonate, 12 partecipanti al banchetto su 13, sottoposti ad esami batteriologici, risultavano positivi a *Salmonella*. Dall'analisi con Epi Info 3.3 sono stati calcolati il Rischio Relativo e i tassi di attacco degli alimenti consumati e si evidenziava che i cannoli di ricotta ingeriti interamente (1 o più di uno) era la probabile causa della MTA, anche la curva epidemica era peculiare per una tossinfezione da *Salmonella*.

Si è rilevato che sono state le uova comprate c/o dei supermarket del luogo a determinare l'epidemia di salmonellosi, ipotesi confermata dagli esiti di laboratorio, dove è stata tipizzata la *Salmonella* del tipo *enteritidis* nei gusci delle uova, stesso sierotipo presente nelle copro-colture dei 2 ricoveri ospedalieri.

ASPETTI MICROBIOLOGICI DEI MIELI DELLA REGIONE LAZIO

Marcella Milito, Stefano Saccares, Giuseppina Migliore, Laura De Santis, Francesco Tomassetti, Elena Dell'Aira, Sonia Amati, Giovanni Formato
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Tra il mese di settembre 2006 e quello di febbraio 2007, sono stati analizzati nel laboratorio di microbiologia del settore apicoltura dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, n. 56 campioni di miele ottenuti dalla raccolta estiva del 2005. Tali campioni, ricevuti direttamente dagli apicoltori in occasione di un concorso regionale, erano contenuti in barattoli di vetro da 500 grammi e provenivano dalle province di: Latina (25 campioni), Frosinone (18 campioni), Roma (11 campioni) e Viterbo (2 campioni).

Relativamente all'origine botanica, i mieli erano così identificabili: millefiori (20 campioni), melata (12 campioni), eucalipto (10 campioni), castagno (7 campioni), acacia (5 campioni), tiglio (1 campione) ed arancio (1 campione).

Le attività di analisi sono state finalizzate soprattutto nella ricerca dei batteri potenzialmente in grado di provocare tossinfezione alimentare nell'uomo.

I risultati hanno evidenziato il rinvenimento nei suddetti 56 campioni di miele prevalentemente di germi Gram positivi, sporigeni, del Genere *Bacillus* (46,5%) e *Clostridium* (16%).

I batteri patogeni rappresentavano il 37,8% del totale dei batteri isolati.

Dei 10 (17,8%) campioni di miele che contenevano germi patogeni per l'uomo, 8 (12,5%) sono risultati positivi per *Bacillus cereus*; 4 (7,1%) sono risultati positivi per *Clostridium sordellii*; 3 (5,3% del totale dei campioni analizzati) sono risultati positivi per *Clostridium perfringens*.

È interessante notare che, dei suddetti 10 campioni, in 5 sono stati riscontrati contemporaneamente 2 diversi germi patogeni per l'uomo, uno dei quali sempre il *B. cereus*; negli altri 5 campioni risultati positivi, è stato riscontrato 1 solo tipo di germe patogeno.

Relativamente ai batteri ambientali (62,2% del totale dei batteri isolati), è stato possibile rilevare: 9 campioni positivi per il *Bacillus subtilis*; 4 positivi per il *Bacillus megaterium*; 2 positivi per il *Bacillus pumilus*; 2 positivi per il *Clostridium sporogenes*; 2 positivi per il *Bacillus circulans*; 2 positivi per il *Paenibacillus alvei*; 2 *Sphingomonas paucimobilis*; 1 *Staphylococcus warnerii*; 1 positivo per *Bacillus licheniformis*.

P27. ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA ENTER-NET IN UMBRIA NEL PERIODO 2002-2006

Roberta Ortenzi, Alessia Zicavo, Silvia Cibotti, Telemaco Cenci, Stefania Scuota
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Si riportano i dati relativi alle notifiche di batteri enteropatogeni effettuate al Centro di Riferimento Regionale di Perugia nel quinquennio 2002-2006.

Dall'analisi dei dati si evince che la quasi totalità dei Laboratori pubblici territoriali che operano in Medicina Umana partecipano attivamente al Sistema di Sorveglianza attraverso l'invio e la notifica puntuale e costante dei ceppi. Nel corso dei cinque anni esaminati, il numero di segnalazioni relative a *Salmonella* spp. di origine umana ha registrato una diminuzione negli ultimi 2 anni. Quello relativo a *Salmonelle* di origine veterinaria è rimasto sostanzialmente invariato; queste ultime vengono per la maggior parte notificate da alcuni Laboratori privati che operano nell'ambito dell'Autocontrollo.

Per quanto riguarda altri enteropatogeni diversi da *Salmonella*, si è osservato invece, a partire dal 2004, un grande aumento delle segnalazioni, rappresentate principalmente da *Campylobacter jejuni* e, in misura molto minore, da *Campylobacter coli*.

I dati riscontrati in Umbria in ambito umano non si discostano significativamente da quelli osservati a livello nazionale per quanto riguarda la distribuzione di *Salmonella* spp nelle varie fasce di età.

Il sierotipo più frequentemente isolato rimane *S. typhimurium*, come osservato a livello nazionale; anche gli altri sierotipi di *Salmonella* più frequentemente isolati ricalcano essenzialmente il dato nazionale, con l'eccezione dei ceppi appartenenti al cosiddetto "nuovo sierotipo" con formula antigenica 4,5,12;i;- , mai rilevati fino al 2002, che nel corso degli anni sono sensibilmente e progressivamente aumentati fino a raggiungere nel 2006 la frequenza del 19%, superiore a quella osservata per *S. enteritidis* (15%). Sono stati osservati, soprattutto negli anni 2003-2004, numerosi casi di infezione sostenuti da *S. Napoli*, concentrati prevalentemente nell'Alta Valle del Tevere.

Nel corso del periodo considerato, *E. coli* O157 è stato isolato una sola volta da fonte umana e due volte da suino, confermando la bassa incidenza del patogeno nella nostra regione.

I ceppi di *Salmonella* di origine veterinaria sono stati isolati prevalentemente da suini, da pollame e dagli alimenti da questi derivati. Bassissimo è invece il riscontro in uova e in preparazioni gastronomiche a base di uova.

Sono rimaste costantemente basse le notificazioni relative a ceppi di *Salmonella* di origine ambientale.

CARATTERIZZAZIONE DI STIPITI UMANI DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* MEDIANTE MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING

Antonio Parisi (a), Carmen Bonanno (b), Giovanni Normanno (c), Angela Miccolupo (a), Gianfranco Santagada (a), Carmine Pedarra (a)

(a) Istituto Zooprofilattico della Puglia e della Basilicata, Putignano, Bari

(b) UOC Microbiologia e Virologia, Ospedale S. Pertini, Roma

(c) Facoltà Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Bari

Campylobacter jejuni rappresenta una delle principali cause di malattia gastro-intestinale trasmesse da alimenti. I dati riportati dalle Autorità Sanitarie Comunitarie (EFSA) relativi alle segnalazioni ottenute da 21 Stati membri nel corso del 2004 riferiscono di un totale di 183.961 casi con un'incidenza di 47,6 casi per 100.000 abitanti.

Al fine di contribuire alla conoscenza della epidemiologia dell'infezione, numerosi studi sono stati indirizzati alla standardizzazione di sistemi molecolari per la caratterizzazione di questo microrganismo, in particolare sono state utilizzate tecniche di *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PCR-RFLP del gene flagellina (*Flatyping*), *Amplified Fragment Length Polymorphism* ecc. Sebbene queste metodiche presentino vantaggi legati alla notevole capacità di discriminazione degli isolati ed ai bassi costi di esecuzione esse risultano difficilmente trasferibili tra i diversi laboratori. L'obiettivo di mettere a punto un sistema di tipizzazione universale è stato raggiunto con la tecnica di *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). Questa consiste nella determinazione della sequenza del DNA di un tratto di sette geni funzionali da confrontare con un database on-line. Ciascuna variazione della sequenza corrisponde ad un diverso numero di allele e la combinazione degli alleli determina il numero di *Sequence Type* (ST) del singolo isolato mentre i ST geneticamente correlati sono riuniti in complessi clonali.

In questo studio 113 stipiti di *C. jejuni* isolati da casi sporadici di malattia gastro-intestinale dell'uomo nel corso degli anni 2001 – 2004 sono stati tipizzati mediante MLST. Di questi 79/113 (70%) venivano attribuiti a 20 complessi clonali precedentemente identificati, in particolare i complessi clonali ST-21, ST-45, ST-61, ST-206, ST-257, ST-353 e ST-354 raggruppavano 60 dei 113 isolati (53%) mentre un numero non superiore a 3 isolati erano identificati per ciascuno degli altri complessi. Dei rimanenti ceppi, 7 venivano identificati come 5 ST non riferibili a complessi clonali noti e 27 permettevano di identificare 24 nuovi ST.

La tecnica di MLST è probabilmente una delle più promettenti tra quelle molecolari; la possibilità infatti di confrontare i dati relativi alla sequenza di geni *housekeeping* con un database internazionale senza risentire di inevitabili variazioni legate alle singole metodiche consente di effettuare studi globali rendendo confrontabili i dati ottenuti. I risultati della presente ricerca sono ampiamente sovrapponibili a quelli osservati in studi analoghi confermando la estrema validità del metodo. Ulteriori studi sono in corso per verificare eventuali similitudini tra stipiti di isolamento umano e animale.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute IZS PB06/05

P28. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E BIOCHIMICA DI *E. COLI* O103 ISOLATI DA CONIGLI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA

Donato Pennelli (a), Antonio Camarda (b), Mario D’Incau (a), Elena Circella (b), Antonio Lavazza (a), Giordano Bruni (b), Patrizia Battista (b), Silvia Tagliabue (a)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia-Romagna, Brescia
(b) Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università degli Studi, Bari

Escherichia coli è un normale abitatore dell’intestino degli animali e dell’uomo, dove partecipa in maniera attiva alla fisiologia dell’apparato digerente; tuttavia, in presenza di fattori predisponenti, associati ad intrinseci fattori di virulenza, *E. coli* può esplicare un’azione patogena. I ceppi responsabili di malattia appartengono al patotipo REPEC (*Rabbit enteropathogenic E. coli*), la cui attività patogena è basata sulla formazione del complesso Intimina-TIR (*Translocated Intimin Receptor*), che permette l’adesione del germe alla mucosa intestinale e la distruzione dei microvilli. Gli stipiti in grado di sintetizzare proteine ad attività patogena quali l’intimina, ma anche AF/R1, AF/R2, sono quindi inclusi in un sottogruppo denominato *Attaching Effacing Escherichia Coli* (AEEC). Precedenti studi hanno inoltre dimostrato che i ceppi di *E. coli* REPEC, in grado di indurre tassi di mortalità anche superiori al 50%, più spesso appartengono a specifici sierogruppi (O2, O8, O15, O20, O26, O103, O139, O141, O153, O157). Va infine ricordato che i ceppi REPEC possono essere differenziati in base al loro profilo biochimico.

Sulla base delle conoscenze della patogenicità dei REPEC, quindi, la caratterizzazione dei geni che codificano per le proteine indicate, in associazione con prove di sieroaagglutinazione lenta per la determinazione degli antigeni somatici lipolisaccaridici (sierogruppo O) e con prove di tipizzazione biochimica (biotipo), può consentire l’individuazione degli stipiti responsabili di colibacillosi in allevamento.

In questo studio sono riportati i risultati delle prove di caratterizzazione dell’intimina e di tipizzazione biochimica di 65 ceppi di *E. coli* appartenenti al sierogruppo O103, che è risultato il sierotipo a maggiore prevalenza in conigli con enterite nel periodo 2003-2006, in allevamenti cunicoli di Lombardia, Emilia-Romagna, Puglia e Basilicata. Il gene *eae* è stato rilevato in 59 (90,8%) dei ceppi; degno di nota è il riscontro contemporaneo in 41 (69,5%) dei ceppi *eae+* di un profilo biochimico ramosio negativo, il quale è stato più volte riconosciuto come valido indice di virulenza del ceppo isolato. Le prove di biotipizzazione hanno permesso l’identificazione di 17 diversi biotipi (B), 6 dei quali ramosio negativi (B0, B1, B4, B8, B12, B13) e 11 ramosio positivi (B16, B17, B20, B21, B22, B23, B24, B28, B29, B30, B31). I biotipi B4 e B0 hanno manifestato una diffusione prevalente, rappresentando rispettivamente il 30,8% ed il 18,5% dei ceppi sottoposti a tipizzazione biochimica.

In conclusione, si ribadisce il ruolo fondamentale svolto dai fattori di virulenza di *E. coli* nello sviluppo della patologia enterica in allevamento intensivo. L’associazione delle tecniche molecolari, biochimiche e di sierotipizzazione, variamente combinabili a seconda delle singole disponibilità in laboratorio, permette di discriminare in maniera altamente specifica i ceppi responsabili di gravi focolai di colibacillosi in allevamento.

SALMONELLA ENTERICA SUBS. ENTERICA SEROTYPE 4,5,12:I:-. NUOVO SEROTYPE O VARIANTE MONOFASICA DI SEROTYPE GIÀ ESISTENTI?

Andrea Piana (a), Antonio Azara (a), Bianca Maria Are (a), Marco Dettori (a), Clementina Cocuzza (b), Elena Muresu (a)

(a) Istituto di Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi, Sassari

(b) Dipartimento Medicina Clinica e Prevenzione, Università degli Studi, Bicocca, Milano

A partire dal 1997, diversi autori hanno segnalato l'isolamento di stipiti di *Salmonella* caratterizzati da *pattern* di multiresistenza e da un particolare profilo sierologico 4,5,12:i:-, assai simile a quello della *S. typhimurium* e della *S. lagos*. In particolare, per la spiccata resistenza agli antibiotici, è stata ipotizzata una discendenza clonale con il *serovar Typhimurium* DT104.

Caratterizzare gli stipiti appartenenti a tale sierotipo dal punto di vista genomico al fine di fornire utili strumenti per una più completa identificazione e, di conseguenza, per un corretto inquadramento tassonomico.

Nel periodo 2000-2006, presso l'Istituto di Igiene e M.P. dell'Università di Sassari, Centro di Riferimento Regionale nella rete di sorveglianza europea delle infezioni da enterobatteri patogeni (Enter-net), sono stati isolati da alimenti (mitili, salsiccia fresca ed hamburger) e da prodotti morbosi umani n. 41 stipiti di *Salmonella* con formula antigenica 4,5,12:i:- e sottoposti a saggio di sensibilità/resistenza agli antibiotici. Tali ceppi sono stati caratterizzati geneticamente con la RAPD e la PFGE e raggruppati tra loro con la *cluster analysis*.

Per frequenza di isolamento, gli stipiti con sierotipo 4,5,12:i:- si collocano al terzo posto dopo *S. enteritidis* e *S. typhimurium* ed il 36,5% ha evidenziato un profilo di multiresistenza. La *cluster analysis*, applicata sui profili elettroforetici della RAPD ha raggruppato i 41 ceppi in due *cluster*, con un coefficiente di similarità pari all'86,1%, indicativo di stipiti "probabilmente correlati". L'analisi di macrorestrizione, ha evidenziato profili che suddividono i microrganismi in 10 *pattern* con minime differenze tra i *fingerprinting*. Gli stipiti sono stati, quindi, raggruppati in due distinti *cluster* considerati "possibilmente correlati" tra loro essendo caratterizzati da un coefficiente di similarità pari all'80,1%. Per suffragare l'ipotesi di discendenza clonale con il *serovar Typhimurium* DT104, 11 stipiti appartenenti a tale sierotipo sono stati sottoposti a PFGE unitamente ai 41 stipiti sierotipo 4,5,12:i:-. La *cluster analysis* ha, nel complesso, raggruppato i 52 microrganismi in 2 *cluster*, con un coefficiente di similarità pari al 77,71% indicativo di stipiti "possibilmente correlati". Peraltro, non è emersa associazione tra *pattern* di sensibilità/resistenza agli antibiotici e profili di macrorestrizione, raggruppando nello stesso *cluster* genomico stipiti con diversificate caratteristiche di resistenza.

I risultati delle analisi molecolari nonché la *cluster analysis* rafforzano l'ipotesi di una identica origine clonale con il *serovar Typhimurium* DT104. La marcata multiresistenza agli antibiotici potrebbe essere uno dei fattori che ha influenzato la recente diffusione di tale sierotipo anche nel nostro territorio.

STIMA DELL'INCIDENZA DELLA SALMONELLOSI IN PROVINCIA DI VARESE ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE DEL METODO CATTURA-RICATTURA

Mirella Pontello (a), Anna Pavan (b), Giuliana Sala (a), Roberto Cavallini (a) Nathalie Pellissier (a) Alessandro Viganò (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia, Virologia, Università degli Studi, Milano*

(b) *Struttura Profilassi Malattie Infettive e Igiene Alimenti e Nutrizione, Direzione Generale Sanità, Regione Lombardia, Milano*

La sorveglianza delle salmonellosi non tifoidee si basa su due principali fonti informative, tra di loro non sovrapponibili:

- il sistema ufficiale rappresentato dalla notifica dei casi di malattia;
- i dati provenienti dai laboratori che effettuano la diagnosi dei casi sia di infezione che di malattia e che - su base volontaria - partecipano alla rete Enter-net.

Le caratteristiche epidemiologiche e cliniche delle salmonellosi (zoonosi veicolata da alimenti nel 95% dei casi; andamento epidemico o anche solo apparentemente sporadico, la presenza o assenza di sintomi dell'infezione gastroenterica; l'evoluzione di regola benigna, con un tasso di ricovero intorno al 20%) spiegano la scarsa sensibilità delle fonti informative ed una larga sottostima dell'incidenza calcolata. Una stima dell'incidenza reale del fenomeno può essere ottenuta attraverso l'applicazione di un particolare strumento epidemiologico, noto come metodo "cattura-ricattura": a partire da fonti informative indipendenti, si può ricavare tale stima in funzione della quota di casi "catturati" o "non catturati" da entrambe le fonti o da una sola di esse. Nel nostro studio abbiamo preso in considerazione le due fonti (notifiche e dati Enter-net) relative alla provincia di Varese, scelta - nell'ambito della Regione Lombardia - quale zona più stabilmente inserita nella rete Enter-Net e per la quale disponiamo dei dati di notifica raccolti in occasione dell'indagine sul sierotipo *Napoli*. Complessivamente abbiamo esaminato 80 casi di salmonellosi notificati nel 2005 e 161 casi rilevati attraverso la segnalazione dell'isolamento di *Salmonella* da parte dei laboratori confluenti alla rete Enter-net. L'incrocio dei dati provenienti dalle due fonti informative è stato effettuato a partire dalla data di nascita del soggetto. Solo nel 32% i casi vengono individuati da entrambe le fonti, mentre i casi sono riconosciuti solo dalle notifiche o dai dati Enter-net rispettivamente nel 12% e nel 56% dei casi. Il numero totale dei casi osservati è 183; il numero di casi stimati applicando il metodo cattura-ricattura è pari a 221 [IC 95% 198-245]. L'incidenza osservata rispetto alla popolazione residente nella provincia di Varese (dato ISTAT) è 21,7/105, quella stimata 26,3/105. L'esame delle due fonti informative fornisce, inoltre, una serie di elementi, che non è qui possibile riferire, per la valutazione della sorveglianza come la completezza delle informazioni, la tempestività, la definizione del sierotipo identificato.

Ringraziamo per la collaborazione la ASL di Varese ed il Laboratorio di Sanità Pubblica della stessa ASL.

EPIDEMIOLOGIA DI *SALMONELLA ENTERITIDIS* NEL TERRITORIO FIORENTINO, PERIODO 2005-2006

Cristina Romani (a), Maria Ida Buonomini (b), Pierluigi Nicoletti (b), Caterina Mammina (c), Antonino Nastasi (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi, Firenze*

(b) *Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Careggi, Firenze*

(c) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi, Palermo*

Nel periodo novembre 2005-gennaio 2006 si è verificata nel territorio fiorentino un'epidemia da *Salmonella enteritidis* di probabile origine alimentare che ha interessato varie mense scolastiche. L'evento, studiato e descritto dal servizio di Sanità Pubblica dell'ASL 10 di Firenze con il supporto del Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Careggi e dell'IZS del Lazio e della Toscana, è stato di particolare interesse in quanto ha coinvolto oltre 150 bambini ma anche in quanto è stata la prima epidemia documentata in Toscana sostenuta da *Salmonella enteritidis*, fagotipo PT8, fino ad ora responsabile solo di casi apparentemente isolati. Scopo della ricerca è stato quello di individuare il profilo degli stipti di *Salmonella enteritidis* circolanti nell'interland fiorentino negli anni 2005-2006 e verificare le caratteristiche molecolari del clone epidemico rispetto a quelle degli stipti circolanti in fase pre- e post-epidemica. A tal fine è stata utilizzata la metodica SE-AFLP modificata precedentemente messa a punto, standardizzata e a basso costo. Sono stati esaminati 124 stipti di *Enteritidis*, divisi in tre gruppi, rispettivamente 37 stipti del periodo pre-epidemico (gennaio-prima settimana di novembre 2005), 32 stipti del periodo epidemico (seconda settimana di novembre 2005-gennaio 2006) ed, infine, 55 del periodo post-epidemico (febbraio-dicembre 2006). Sono stati individuati 5 profili SE-AFLP. I profili A e C, che coincidono con quelli precedentemente descritti su *Enteritidis* isolate in Italia, risultano i tipi prevalenti, essendo il tipo A e il tipo C rispettivamente pari al 37,9 e al 51,6% degli esaminati. I tre nuovi profili, evidenziati con le lettere P, T e Z, sono appannaggio soltanto di 13 stipti e, quindi, a scarsa prevalenza. Gli stipti epidemici sono risultati appartenere al profilo C mentre il profilo A prevale nel periodo pre-epidemico e negli ultimi mesi del 2006. Vengono ampiamente commentati i risultati soprattutto in rapporto alla diversa frequenza dei profili nei tre periodi di osservazione. Questi dati vogliono essere un contributo all'epidemiologia di *Enteritidis* e rappresentare il tempo zero nella conoscenza della storia naturale di questo sierotipo nel territorio fiorentino.

P29. PREVALENZA DEL GENE CODIFICANTE LA COMPONENTE L2 DELL'ENTEROTOSSINA HBL IN CEPPI DI *BACILLUS CEREUS* VALUTATA MEDIANTE TEST IMMUNOENZIMATICO E PCR

Mariana Rotili (a), Manuela Tamburro (a), Giancarlo Ripabelli (a), Michela Lucia Sammarco (a), Giampaolo Colavita (b)

(a) *Dipartimento di Scienze per la Salute, Università degli Studi del Molise, Campobasso*

(b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari Ambientali e Microbiologiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi del Molise, Campobasso*

Bacillus cereus contamina spesso cibi crudi, secchi e lavorati, causando tossinfezioni alimentari. Diverse tossine sono responsabili della sintomatologia tra cui una tossina emetica (cereulide) che provoca vomito e nausea e tre enterotossine, l'emolisina BL (HBL), l'enterotossina T e la tossina non emolitica (NHE), che causano diarrea acquosa, dolori e crampi addominali. Il complesso proteico HBL è costituito dalla componente B, prodotta del gene *hblA*, che agisce come subunità di legame della tossina, e dalle subunità litiche, L1 e L2, codificate rispettivamente dal gene *hblD* e *hblC*. Le singole subunità sono tutte necessarie per l'espressione dell'attività emolitica, citotossica e dermonecrotica, rendendo la tossina HBL il principale fattore di virulenza del patogeno. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare e confrontare, in 99 ceppi di *B. cereus* isolati da diverse matrici alimentari, la prevalenza della componente L2 mediante kit *Bacillus cereus Enterotoxin Reverse Passive Latex Agglutination* (BCET-RPLA, *Oxoid*) e amplificazione del gene *hblC*, codificante per la stessa subunità. La presenza della componente L2 è stata riscontrata in 56/99 ceppi (56,6%) mediante test immunoenzimatico, mentre il gene è stato amplificato da 59/99 isolati (59,6%). Solo in 46/99 ceppi (46,5%), isolati principalmente da pasta farcita, uova, latte e derivati, la subunità L2 è stata identificata sia mediante PCR sia con il test RPLA. Dai risultati ottenuti con le due metodiche è emerso che la presenza della subunità L2 è stata prevalente in ceppi isolati da alimenti che, dopo cottura, sono spesso conservati in maniera inadeguata a temperatura ambiente (pasta al forno, lasagne). In più, la presenza di glucosio e/o di amido tende a incrementare la produzione di enterotossina. Inoltre, molti ceppi in cui è stata potenzialmente identificata la tossina sono stati isolati da carne, uova, latte e derivati, alimenti conservati abitualmente a temperature di frigorifero, condizione che però non garantisce l'assenza di attività biosintetica. Il test BCET-RPLA è comunemente utilizzato per determinare la produzione delle enterotossine da parte di *B. cereus*. Tuttavia, la possibilità di avere falsi positivi e/o negativi è ampiamente riportata in letteratura, poiché manca ancora una completa identificazione delle enterotossine prodotte. Infatti, alcuni ceppi risultati positivi al test immunoenzimatico non sono stati confermati dall'amplificazione del gene *hblC*, probabilmente a causa di una risposta aspecifica del kit o per la presenza di mutazioni nella sequenza di appaiamento dei *primer*. Quest'ultima ipotesi concorda con i dati di letteratura che evidenziano l'instabilità dei geni codificanti per le enterotossine in *B. cereus*. Pertanto, per una definitiva valutazione della capacità enterotossica di ceppi di *B. cereus* è utile eseguire prove specifiche di citotossicità, come ad esempio il test *in vitro* ICA (*Improved Cytotoxicity Assay*) effettuato su linee cellulari McCoy.

P30. ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DI SALMONELLA SP. APPARTENENTI A DIFFERENTI SIEROTIPI ISOLATI DA ALIMENTI E CASI CLINICI

Concetta Scalfaro (a), Leucio Orefice (a), Emma Filetici (b), Ildo Benedetti (b)

(a) *Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

All'origine degli episodi tossinfettivi alimentari, sussistono talvolta livelli di contaminazione delle materie prime non particolarmente elevati, con coinvolgimento di numerosi consumatori situati anche in aree geografiche diverse.

Usando le classiche indagini epidemiologiche, risulta difficile ricondurre i singoli casi, apparentemente non correlati tra loro, ad un particolare focolaio epidemico.

L'uso di metodi analitici molecolari rivolti alla tipizzazione dei ceppi si è dimostrato utile sia nelle ricerche negli alimenti che in quelle nei pazienti, a causa di un più alto potenziale di discriminazione fra microrganismi con un pattern biochimico simile. In particolare, l'utilizzo della PFGE nell'identificazione di cloni batterici epidemici è ormai un metodo consolidato per tracciare il percorso epidemiologico degli agenti responsabili di episodi di tossinfezioni alimentari.

In questo lavoro sono stati esaminati 150 ceppi di *Salmonella* sp., appartenenti ai sierotipi più frequentemente isolati negli ultimi anni in Italia, prevalentemente da alimenti che da casi clinici, al fine di contribuire alla creazione di un database di *pulsotipi* e, nel contempo, di verificare l'attitudine più o meno spiccata dei diversi sierotipi a presentare una diversificazione dei profili molecolari, ovviamente più significativa quando maggiormente accentuata.

I risultati ottenuti hanno pertanto permesso di stabilire una graduatoria di variabilità dei sierotipi in base alla morfologia dei profili: si va da quelli relativamente stabili quali *S. Infantis*, ad altri a media variabilità come *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, ad altri ancora più variabili come *S. derby*.

In particolare è stato osservato quanto segue:

- per i ceppi di *S. Infantis* isolati da alimenti, oltre l'80% dei profili ottenuti erano praticamente sovrapponibili, potendosi concludere per un'elevata omogeneità dei ceppi esaminati;
- all'altro estremo, considerando i profili relativi ai ceppi di *S. derby*, pure questi isolati dagli alimenti, è stata riconosciuta una maggiore variabilità. Il pulsotipo più rappresentato non ha superato, in questo caso, il 40%.

Alla luce di queste considerazioni e con la riserva di ulteriori conferme, si può ipotizzare che una PFGE condotta su alcuni sierotipi piuttosto che su altri, possa fornire maggiori elementi per una rintracciabilità dell'origine di una contaminazione alimentare.

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORE DI VEROCITOTOSSINA (VTEC) SIEROGRUPPO O26 IN ITALIA: COSA È CAMBIATO?

Gaia Scavia, Martina Escher, Alessandro Fioravanti, Maria Luisa Marziano, Fabio Minelli, Alfredo Caprioli

Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'infezione da ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) è responsabile nell'uomo di quadri clinici gastro-enterici, di varia gravità. La sindrome emolitico-uremica (SEU), frequente soprattutto in età pediatrica, ne rappresenta la più seria complicanza sistemica.

Le infezioni da VTEC risultano particolarmente frequenti nei paesi industrializzati dove *E. coli* O157 rappresenta il sierogruppo più noto e diffuso. Negli ultimi anni, tuttavia, si è assistito ad un aumento dei casi d'infezione associati ad altri sierogruppi VTEC. In particolare, la frequenza di isolamento di VTEC O26, sia da casi sporadici sia da episodi epidemici, è andata progressivamente aumentando. L'emergenza di tale sierogruppo viene in parte attribuita alla comparsa di stipti portatori del gene *vtx2*, dotati di un miglior adattamento all'uomo.

Nel nostro paese il primo isolamento di VTEC O26 risale al 1989 da un paziente HIV+; nel 1993 è stato isolato per la prima volta un ceppo O26 portatore del gene *vtx2*, da un paziente pediatrico deceduto in seguito a SEU.

A partire dal 1988, sono stati raccolti 15 ceppi VTEC O26 responsabili di infezioni nell'uomo; tutti i ceppi portatore del gene *vtx2* erano associati a SEU.

Da tale data sono stati complessivamente individuati 75 casi di SEU pediatrica associati a VTEC O26, pari al 28,4% dei casi totali di SEU associati a VTEC. A partire dal 1997 il sierogruppo O26 costituisce anche quello più frequentemente diagnosticato dai casi di SEU e, considerando l'intero periodo di sorveglianza (1988-2007), il secondo dopo *E. coli* O157.

La distribuzione territoriale dei pazienti con SEU associata a VTEC O26 appare disomogenea, con una elevata concentrazione in Campania (26 casi) e in Piemonte (12 casi). In queste stesse regioni sono stati osservati 5 *cluster* di casi di SEU associati a VTEC O26: 3 casi a Napoli (1997); 3+3 casi in provincia di Salerno (2005); 3 casi in provincia di Torino (2007), 2 casi in provincia di Vercelli (1999), 2 casi in provincia di Cuneo (2000). La manifestazione dei casi d'infezione da VTEC O26 in un ristretto arco spazio-temporale è apparsa più frequente rispetto ad altri sierogruppi VTEC, nel corso dello stesso periodo di sorveglianza.

Da un punto di vista clinico i casi d'infezione da VTEC O26 non raramente sono risultati associati a sintomatologia di estrema gravità. Infine l'età mediana dei pazienti con SEU associata a VTEC O26 (17 mesi; N=73) è risultata significativamente inferiore rispetto agli altri sierogruppi VTEC (26 mesi; N=219).

Tutto ciò contribuisce a riconoscere a VTEC O26 un ruolo tutt'altro che trascurabile e a delinearne un quadro epidemiologico peculiare che può contribuire ad orientare ulteriori ed indispensabili approfondimenti di tipo diagnostico ed epidemiologico.

PREVALENZA, ANTIBIOTICO-RESISTENZA E RICERCA DI GENI DI VIRULENZA IN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATI NELLA FILIERA DI PRODUZIONE AVICOLA

Manuela Tamburro, Lorenzo Torosantucci, Annalisa Leone, Giancarlo Ripabelli, Guido Maria Grasso
Cattedra di Igiene, Dipartimento di Scienze per la Salute, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Negli allevamenti avicoli la presenza di *Campylobacter* spp. può essere favorita da inadeguate condizioni igienico-sanitarie, alta densità ed eccessivo sfruttamento degli animali. L'utilizzo di antibiotici in zootecnia, inoltre, ha determinato una crescente diffusione di ceppi antibiotico-resistenti. I meccanismi patogenetici sono definiti da alcuni determinanti di virulenza, quali flagelli (gene *flaA*), adesina CadF (gene *cadF*), lipoproteina fondamentale per l'acquisizione del ferro (gene *ceuE*) e tossina CDT (*Cytolethal Distending Toxin*), costituita dalle subunità CdtA, CdtB e CdtC (gene *cdt cluster* che raggruppa i geni *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). L'olotossina causa distensione del citoplasma, arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M ed eventuale morte delle cellule. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare prevalenza, antibiotico-resistenza e virulenza, amplificando geni codificanti per fattori patogenetici, di *Campylobacter* spp. isolati in due aziende avicole. I prelievi sono stati effettuati da tamponi cloacali e ambientali (pollaio, locale confezionamento uova), acqua, mangime (silos, mangiatoia) e uova (guscio, tuorlo/albume).

Campylobacter spp. è stato isolato in 62/372 campioni (16,6%), dei quali 54/62 (87%) erano tamponi cloacali, 5 tamponi ambientali (3 locale confezionamento, 2 pollaio) e 3 gusci. Tutti i ceppi sono stati identificati come *C. jejuni* mediante prove biochimiche e PCR. Le resistenze agli antimicrobici sono state: cefalotina (90%), ampicillina (63%), acido nalidixico (61%), enrofloxacin (56%), tetraciclina (55%), SXT - sulfonamide - ciprofloxacina (53%) e cefotaxime (50%). Tutti gli isolati sono risultati, invece, sensibili a cloramfenicolo, eritromicina e gentamicina. Le prevalenze dei geni testati sono state: *flaA* 80,7%; *cadF* 84%; *ceuE* 38,7%, *cdtA* 98,4%; *cdtB* 95,2%; *cdtC* 97,0%; *cdt cluster* 82,3%.

La presenza di *C. jejuni* nell'allevamento avicolo conferma il ruolo che i prodotti di origine animale e gli animali stessi possono esplicare nella trasmissione dell'infezione. Il patogeno potrebbe entrare nell'allevamento tramite vettori (acqua, mangimi, insetti, uccelli) o gli operatori stessi. L'elevata prevalenza nei tamponi cloacali conferma il pollame quale serbatoio d'elezione di *C. jejuni*. Nessun campione di tuorlo/albume è risultato contaminato, indicando la limitata capacità del patogeno di penetrare nelle uova e la rara possibilità della trasmissione verticale; l'isolamento dai gusci, invece, dimostra il rischio di contaminazione ambientale soprattutto nel locale di confezionamento. L'elevata resistenza ai fluorochinoloni, comunemente utilizzati in campo umano, è associabile all'uso fatto in ambito zootecnico, suggerendo la necessità di una maggiore sorveglianza igienico-sanitaria nella filiera avicola. L'alta prevalenza di geni implicati nella patogenesi dimostra che gli animali sono serbatoi di ceppi potenzialmente patogeni per l'uomo. La presenza di tali determinanti, tuttavia, non implica necessariamente un'attività patogenetica e citotossica.

P31. RISCHIO MICROBIOLOGICO ASSOCIATO AL CONSUMO DI PRODOTTI DI O.A. PROVENIENTI DA PAESI TERZI

Grazia Tasselli, Antonella Magni, Gabriele De Santis, Maria Faillone, Clelia Logoluso,
Pietro Debidda, Elena Bianchi, Cristina Cacciapuoti

Posto di Ispezione Frontaliero (PIF), Ministero della Salute, Livorno

A seguito del processo di espansione dei mercati e globalizzazione dell'offerta la Comunità Europea ha visto intensificare negli ultimi anni le importazioni dai paesi Terzi di prodotti alimentari di origine animale. Questi prodotti, importati da paesi Terzi inseriti in elenco CE, entrano nel territorio comunitario attraverso i Posti di Ispezione Frontaliera (PIF) e sono soggetti ad una serie di controlli atti a verificarne la conformità secondo la legislazione vigente.

Il Libro Bianco nel definire la politica per la nuova legislazione in materia di sicurezza alimentare ribadisce il costante riferimento all'analisi del rischio e fa richiamo alla garanzia di estrema igiene della produzione e alla qualità dei prodotti forniti. La legislazione del pacchetto igiene effettua pure costanti collegamenti alla metodologia dell'analisi del rischio sia nelle norme che riguardano l'igiene della produzione sia nei controlli ufficiali.

Nell'ambito dei Piani di monitoraggio previsti dal Reg. 136/2004 e alla luce dell'applicazione della recente normativa comunitaria in termini di sicurezza alimentare è stato sviluppato uno studio triennale che ha visto la messa a punto di appropriati controlli ufficiali per la ricerca di microrganismi patogeni e loro possibili tossine in prodotti alimentari di O.A., provenienti da paesi Terzi, introdotti in territorio nazionale attraverso il Posto di Ispezione Frontaliero di Livorno. L'analisi dei valori raccolti ha permesso la determinazione delle più frequenti contaminazioni biologiche negli alimenti.

Considerato che l'obiettivo di sicurezza alimentare è rappresentato dalla massima prevalenza o dalla concentrazione del pericolo microbiologico nel prodotto al momento del consumo, ovviamente compatibile con il livello di protezione previsto, la raccolta dei dati ottenuta ha permesso anche di valutare l'incidenza di alcuni principali microrganismi patogeni ed effettuare una valutazione del rischio microbiologico per il consumatore finale dei prodotti medesimi. Si realizza pertanto lo scopo del controllo ufficiale volto a prevenire, o almeno a ridurre a valore accettabile, il rischio microbiologico per la salute pubblica, proteggere gli interessi dei consumatori e ad assicurare la trasparenza delle transazioni commerciali.

P32. FREQUENZE DEGLI ISOLAMENTI DI SALMONELLA DA UOMO, ALIMENTI ED ANIMALI NELL'AMBITO DELLA SORVEGLIANZA DEL CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER GLI ENTEROBATTERI PATOGENI DELL' IZS LAZIO E TOSCANA NEL TRIENNIO 2004-2006

Rita Tolli, Gina Di Giampietro, Maria Grazia Marrocco, Emanuela Lupacchino, Stefano Bilei
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Il Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni esegue per la sorveglianza di laboratorio nell'ambito delle reti Enter-net (Enteric Pathogen Network) ed Enter-vet, la sierotipizzazione di stipiti di *Salmonella* isolati dall'uomo nella Regione Lazio e da campioni di origine veterinaria nelle Regioni Lazio e Toscana.

Nel periodo 2004-2006 sono stati analizzati complessivamente 2.402 ceppi di *Salmonella* di cui 1.513 (63%) di origine umana e 889 (37%) di origine veterinaria (alimenti e animali).

Nell'uomo i sierotipi con maggior frequenza di isolamento risultano *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. *S. typhimurium*, 45,8% nel 2004 e 40,6% nel 2005, ha fatto registrare nel 2006 un sensibile decremento (25,2%) cui è corrisposto una netta inversione nella prevalenza di *S. enteritidis* che ha raggiunto la soglia del 41,6% dopo essersi situata ai valori di 28,6% e 27% nel biennio 2004-2005. Consolidata al terzo posto come frequenza di isolamento, *Salmonella* 4,[5],12:i:-, sierotipo che si sta imponendo all'attenzione per il costante e progressivo incremento nel corso degli anni (2,5%-6,7%-9,2%). Nello corso dello stesso periodo da segnalare l'aumento degli isolati di *S. Napoli* (0,66%-0,95% - 1,8%).

Nei campioni di origine veterinaria, i sierotipi più frequentemente isolati sono stati *S. typhimurium* e *S. Derby*. *S. typhimurium* nel 2006 si conferma, come negli anni precedenti (13,6% nel 2004 e 37% nel 2005), il sierotipo prevalente negli animali (26,5%) seguito da *S. abortusovis* (11%).

Negli alimenti di origine animale i sierotipi più frequentemente isolati nel 2004 e nel 2005 sono risultati *S. typhimurium* (31,8% e 21,5% rispettivamente) e *S. Derby* (14,8% e 16,9% rispettivamente), situazione capovolta nel 2006 quando, il sierotipo più isolato è risultato *S. Derby* (22,9%) con la quasi totalità dei ceppi provenienti da prodotti di origine suina, seguito da *S. typhimurium* (20,8%).

La presenza di *Salmonella* 4,[5],12:i:- nel corso del 2004, è stata rilevata esclusivamente in soggetti della specie suina (4,9%), con nessun riscontro positivo nel 2005 mentre, nel 2006 gli isolamenti sono stati ottenuti solo dal pollo e da altri volatili (4,4%) ma non dal suino. Negli alimenti di origine animale questo sierotipo è risultato scarsamente isolato con soli 3 riscontri nel 2004 da alimenti di origine suina e da carne di tacchino, 2 nel 2005, entrambi da carne suina fresca e 10 nel 2006 (10,4%) di cui 9 da carni suine e 1 da un campione di vongole.

P33. RICERCA DI GENI CODIFICANTI PER TOSSINE IN CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* MEDIANTE *REAL-TIME* PCR E CONFRONTO CON METODICHE TRADIZIONALI

Lorenzo Torosantucci (a), Annalisa Leone (a), Kathie Grant (b), Giancarlo Ripabelli (a), Jim McLauchlin (b)

(a) *Cattedra di Igiene, Dipartimento di Scienze per la Salute, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi del Molise, Campobasso*

(b) *Health Protection Agency, Food Safety Microbiology Laboratory, London, UK*

Il *Clostridium perfringens* tipo A è patogeno per l'uomo quando presenta oltre al gene *cpa*, codificante per la tossina α , anche il gene *cpe*, codificante per *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). Quest'ultima, quando è associata alla tossina beta2 (CPB2), conferisce maggiore aggressività e resistenza al microrganismo. Le metodiche tradizionali, seppur affidabili, mostrano dei limiti nell'identificazione di alcune tossine, in particolare CPE e CPB2.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di sviluppare un protocollo di *real-time* PCR con tecnologia TaqMan per identificare i geni *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* e *cpb2* codificanti rispettivamente per le tossine α , β , ϵ , ι , CPE, CPB2, confrontandone la specificità e la sensibilità rispetto alle metodiche tradizionali come i test immunoenzimatici e la sierotipizzazione.

L'analisi di *real-time* PCR è stata validata utilizzando 16 ceppi NCTC di *C. perfringens* (A-E), di cui era noto l'assetto genetico rispetto alla produzione di tossine, e 12 ceppi NCTC appartenenti ad altre specie batteriche. Tutti i *primer* e le sonde TaqMan utilizzati, ad eccezione di quelli per i geni *cpa* e *cpe*, sono stati disegnati *ex novo* mediante software *Primer Express*. Il protocollo validato su ceppi NCTC è stato, quindi, utilizzato per lo studio di 54 ceppi di *C. perfringens* precedentemente sottoposti a sierotipizzazione e test immunoenzimatico per la ricerca dei prodotti dei geni *cpa* e/o *cpe*. In particolare, gli isolati analizzati provenivano da alimenti (20 da carne di manzo) e da 2 episodi epidemici verificatisi, rispettivamente, a Londra (18 isolati da feci) e Hesselwood (16 isolati di cui 2 da pollo, 4 da sugo, 10 da feci). I risultati sui ceppi di riferimento sono risultati pienamente concordi con le indicazioni date dall'NCTC. Negli isolati da alimenti, 19/20 sono risultati positivi ai geni *cpa* e *cpe*, 1/20 a *cpa* e *cpb2*. Quest'ultimo ceppo, in effetti, apparteneva al sierotipo 55, mentre tutti gli altri al sierotipo 71. Tutti i ceppi epidemici di Londra hanno mostrato presenza dei geni *cpa* e *cpe*. I ceppi epidemici di Hesselwood contenevano il gene *cpa*, mentre solo 7/16 (44%) (2/7 da pollo, 4/7 da sugo, 1/7 da feci) hanno mostrato anche il gene *cpe*. I geni *cpb*, *etx*, *iap*, *cpb2* non sono stati rilevati in nessuno di questi ceppi epidemici. I nostri dati hanno confermato quelli ottenuti con le metodiche tradizionali riguardo l'identificazione e la valutazione della patogenicità di *Clostridium perfringens* tipo A (geni *cpa* e *cpe*) fornendo, inoltre, una visione complessiva della prevalenza dei geni codificanti per altre tossine, come nel caso del ceppo contenente il gene *cpb2* non rilevato con i metodi tradizionali. La *real-time* PCR potrebbe, pertanto, risultare utile per la

genotipizzazione di *C. perfringens* in numerosi campioni, in maniera rapida, altamente sensibile, specifica e riproducibile; è una tecnica discriminante che fornisce indicazioni di carattere epidemiologico ed igienico-sanitario, garantendo un rapido ritorno diagnostico per tracciare le fonti di contaminazione e le vie di trasmissione del microrganismo.

P34. COMPARAZIONE GENOMICA DI ISOLATI DI *ESCHERICHIA COLI* O157 MEDIANTE LA TECNICA DEI *MICROARRAY*

Rosangela Tozzoli (a), Muna Anjum (b), Roberto La Ragione (b), Alfredo Caprioli (a), Stefano Morabito (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge, UK*

Escherichia coli O157 è un patogeno zoonotico in grado di causare patologie gravi nell'uomo, quali la colite emorragica e la sindrome emolitico uremica. I principali fattori di virulenza del microrganismo sono costituiti dalle Verocitotossine (VT) e dall'isola di patogenicità LEE responsabile del particolare meccanismo di adesione agli enterociti, noto come *Attaching and Effacing* (A/E). Il tratto gastro-intestinale dei ruminanti, in particolare dei bovini, costituisce il serbatoio naturale di questo microrganismo, e la trasmissione all'uomo può avvenire attraverso il consumo di alimenti contaminati. La tipizzazione degli isolati di *E. coli* O157 è indispensabile per definire l'epidemiologia delle infezioni. Tra le metodiche utilizzabili, la determinazione del fagotipo (Pt) rimane una delle più utilizzate, soprattutto per comparare isolati che non hanno correlazioni epidemiologiche dirette. Vi sono evidenze che nel tratto gastro-intestinale dei bovini esistano numerose sottopopolazioni di *E. coli* O157, ed è stata avanzata l'ipotesi che alcune di queste possano presentare una maggiore virulenza o una più efficiente capacità di colonizzare l'ospite. Un'indagine svolta su una collezione di ceppi di *E. coli* O157 ha mostrato una distribuzione non omogenea dei fagotipi tra isolati bovini e umani. In particolare, alcuni fagotipi molto comuni tra i bovini (come il Pt21) sono raramente riscontrati nelle infezioni umane, dove predominano fagotipi meno frequenti nei bovini, quali il Pt8 e Pt2. Sono stati selezionati dieci ceppi di *E. coli* O157 Pt8 di origine umana e dieci ceppi Pt21 di origine animale sono stati comparati a livello genomico per identificare possibili differenze genetiche responsabili di questa distribuzione disomogenea. I ceppi sono stati inizialmente esaminati mediante PCR per la presenza dei principali determinanti di virulenza e successivamente sottoposti a comparazione genomica mediante la tecnica dei microarray utilizzando vetrini stampati al VLA, contenenti sonde corrispondenti al completo assetto di Orfs di due ceppi di riferimento O157 e un ceppo di *E. coli* K-12.

L'analisi PCR non ha evidenziato differenze rilevanti mentre l'approccio *microarray* ha permesso di identificare alcune regioni genomiche polimorfiche che sembrano essere associate ai due gruppi di *E. coli* O157 saggiati. I polimorfismi identificati corrispondevano ad alcune regioni del batteriofago che trasduce i geni codificanti la VT2 ed in particolare quella contenente l'antiterminatore Q, coinvolto nella regolazione dell'espressione della VT, e quella codificante la subunità B della VT stessa. Questi risultati confermano dati di letteratura che identificano nella VT2 un determinante associato a quadri morbosi con sintomatologia più grave in seguito ad infezione da *E. coli* produttori di verocitotossina nell'uomo e contribuiscono a chiarire i meccanismi molecolari alla base delle differenze epidemiologiche osservate.

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERITIDIS* ISOLATI DA CASI SPORADICI UMANI

Maria Beatrice Valli (a), Monica Staffolani (a), Anna Maria Dionisi (b), Ildo Benedetti (b), Sergio Arena (b), Stefano Fisichella (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Salmonella spp. è uno dei più comuni agenti zoonotici responsabile della patologia gastroenterica infettiva a trasmissione alimentare nell'uomo. La normativa comunitaria sulle zoonosi individua la *Salmonella* tra gli agenti di maggiore interesse sanitario e ribadisce, ai fini di una sorveglianza, l'importanza della tipizzazione degli isolati per individuare i cloni clinicamente rilevanti e le fonti d'infezione. *S. enterica* sierotipo *Enteritidis* rappresenta, insieme a *S. typhimurium*, il sierotipo più frequentemente isolato da casi di infezione nell'uomo.

Obiettivo del lavoro è stato quello di valutare il contributo della tipizzazione molecolare mediante l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE), affiancata a tecniche tradizionali, quali sierotipizzazione e fagotipizzazione, nell'ambito della sorveglianza epidemiologica di casi sporadici di *S. enterica* sierotipo *Enteritidis* nella Regione Marche. Per lo studio, 134 ceppi di *S. enteritidis*, isolati da infezioni umane, dalla fine del 2001 al 2006 sono stati analizzati mediante PFGE secondo il protocollo standardizzato a livello europeo nell'ambito del progetto Salm-gene. I dati ottenuti sono stati elaborati con i softwares BioNumerics ed EpiInfo, rispettivamente per l'identificazione dei profili elettroforetici e l'analisi statistica dei dati.

Sono stati individuati 12 distinti profili elettroforetici di *S. enteritidis*, tre dei quali, SENTXB0001 (40,70%), SENTXB0005 (26,80%) e SENTXB0002 (18,70%), costituiscono insieme oltre l'85% di tutti gli isolati. In linea con i dati europei, si evidenzia che il profilo prevalente, SENTXB0001, è strettamente associato al fagotipo PT4 ed il profilo SENTXB0005 ai fagotipi PT8 e PT21, mentre si osserva un'associazione tra SENTXB0002 e il fagotipo PT2 (5/10 corrispondente al 50%), non riscontrata in Europa.

La distribuzione geografica dei profili elettroforetici identificati, mostra una prevalenza dei ceppi con profilo SENTXB0001 nel centro-nord delle Marche (80%), i ceppi con profilo SENTXB0005 risultano più frequenti nella provincia di Macerata (53%) mentre ceppi SENTXB0002 sembrano essere distribuiti più uniformemente in tutta la regione. Anche la distribuzione dei profili elettroforetici in relazione alle fasce d'età non è uniforme, il profilo SENTXB0005 non viene isolato nella fascia d'età 6-15 anni, mentre il profilo SENTXB0002 prevale nei soggetti di età tra 1 e 15 anni.

La tipizzazione molecolare mediante PFGE si è rivelata un ottimo strumento di indagine epidemiologica nell'ambito della sorveglianza di *S. enteritidis* in quanto, affiancata alle tradizionali tecniche di tipizzazione, permette l'identificazione di particolari cloni circolanti nella regione, inoltre, se fosse applicata all'analisi di ceppi di *S. enteritidis* isolati da alimenti e animali potrebbe consentire l'individuazione di possibili fonti di contagio e dei veicoli di trasmissione.

RILEVAZIONE DI COXIELLA BURNETII NEL LATTE DI MASSA DI ALCUNE AZIENDE BOVINE LOMBARDE

Nadia Vicari, Simone Magnino, Giuseppina Andreoli, Pier Giorgio Vigo, Iris Labalestra, Massimo Fabbi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Pavia

Coxiella burnetii è l'agente della Febbre Q, una zoonosi batterica descritta in Italia a partire dal 1944-45, e segnalata in diversi paesi tra le patologie riproduttive dei ruminanti domestici.

Recentemente sono stati segnalati nel nostro paese alcuni casi di malattia nell'uomo verificatisi in seguito a contatto sia diretto sia indiretto - tramite aerosol contaminato veicolato dall'aria - con ruminanti infetti (pecore e bovini).

È noto che gli animali infetti possono eliminare *C. burnetii* nell'ambiente tramite diversi escreti quali feci, urine, secreto vaginale, liquido amniotico e secreti quali latte e colostro. Studi condotti in altri paesi hanno già rilevato la presenza di *C. burnetii* nel latte di massa bovino, un'evenienza che merita di essere valutata nell'ambito dell'epidemiologia dell'infezione. In questa comunicazione si riportano i dati preliminari di un'indagine volta al rilevamento di *C. burnetii* in campioni di latte di massa di aziende bovine lombarde della provincia di Pavia.

Su 174 campioni di latte di massa prelevati nel corso del 2006 in 125 aziende bovine è stata effettuata la ricerca di *C. burnetii* con una metodica PCR volta all'amplificazione di un frammento della regione genomica *transposon-like* caratteristica del batterio, seguita da una restrizione enzimatica di conferma. La metodica è stata messa a punto da autori francesi che ne hanno dimostrato la buona specificità e sensibilità su campioni di latte, feci e tamponi genitali di pecore infette. In 75 aziende è stato esaminato un solo campione di latte di massa, mentre per le rimanenti 50 aziende la ricerca è stata eseguita su due campioni di latte prelevati a distanza di qualche mese.

38 campioni su 174, pari al 21,8%, sono risultati positivi. I campioni di latte prelevati in tempi successivi sono risultati entrambi negativi in 29 aziende, entrambi positivi in 5 aziende e discordanti nelle rimanenti 16. Tra queste, 12 aziende sono risultate positive al primo campionamento e negative al successivo e 4 viceversa, cioè negative al primo campionamento e positive al secondo.

Questi risultati preliminari suggeriscono un'importante - e in qualche modo inaspettata - circolazione di *C. burnetii* nelle aziende bovine campionate e pongono interrogativi riguardo al significato del ritrovamento in relazione ai rischi sanitari a cui possono essere esposti gli operatori del settore.

P35. INTEGRONI DI CLASSE 1 E GENI DI RESISTENZA IN CEPPI DI SALMONELLA ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Maria Ziccheddu, Daniela Manunta, Sebastiano Virgilio, Stefano Lollai
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

Al fine di valutare la resistenza antibiotica, 75 ceppi di *Salmonella* spp., isolati prevalentemente da carni insaccate di produzione locale, presso l'Istituto Zooprofilattico della Sardegna, nel periodo 2002-2006, sono stati testati verso 18 antibiotici ed esaminati per la presenza di integroni di classe 1 e 2 e geni di resistenza.

I ceppi sono stati testati con ampicillina, amoxicillina/ac. clavulanico, cloramfenicolo, streptomina, spectinomicina, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, trimetoprim-sulfametoxazolo, cefotaxime, cefalotina, colistina, enrofloxacin e ciprofloxacina, mediante tecnica Kirby-Bauer e linee-guida CLSI. Gli integroni sono stati ricercati tramite PCR con *primer* per i geni *int1*, *int2* e per i segmenti 5'CS e 3'CS. Gli amplificati sono stati sequenziati. Per verificare la localizzazione degli integroni è stato isolato il DNA plasmidico e ricercati i geni *int1* e CS. I geni di resistenza alle tetracicline *tet A*, *tet B* e *tet C* sono stati cercati tramite PCR.

Il 76% dei ceppi di testati è risultato resistente a più antibiotici, con alte percentuali verso tetracicline (57%), streptomina (34%), ampicillina (41%), amoxicillina/ac. clavulanico (30%), trimetoprim-sulfametoxazolo (20%). In minore percentuale verso cefalotina (10,6%), cloramfenicolo (9,3%), gentamicina (8%), kanamicina (6,6%), neomicina (6,6%), spectinomicina (12%). La totalità dei ceppi è risultata sensibile a cefotaxime, colistina, ciprofloxacina, enrofloxacin, amikacina.

Il 19% dei ceppi resistenti ha mostrato integroni di classe 1 ma non di classe 2. I ceppi integrasi positivi hanno presentato ampliconi di 1.000-bp, 1.600-bp, 1.900-bp, 200bp e 150 bp. I sequenziamenti hanno rivelato che l'amplicone di 1.000 bp portava il gene *aadA2*, che conferisce resistenza alla streptomina e alla spectinomicina, l'amplicone di 1.600-bp i geni *aadA1* e *dhfr1* (resistenza a spectinomicina, streptomina e trimetoprim-sulfametoxazolo), l'amplicone di 1.900-bp i geni *aadA2*, *aadA1* e *bla_{oxa}*, quest'ultimo responsabile della resistenza a beta-lattamici. Il gene *int1* e i segmenti 5'CS e 3'CS sono stati riscontrati nel DNA plasmidico. Tutti i ceppi resistenti alle tetracicline hanno evidenziato i geni *tet A*, *tet B* o entrambi.

Geni responsabili della resistenza fenotipica ad aminoglicosidi, trimetoprim-sulfametoxazolo e beta-lattamici sono risultati inseriti in integroni veicolati da plasmidi. I determinanti di resistenza alle tetracicline risultano probabilmente esterni agli integroni. Elementi genetici mobili potrebbero svolgere quindi un ruolo importante nella trasmissione e disseminazione di geni di resistenza. Questi dati confermano il ruolo di alimenti di provenienza animale come reservoir di *Salmonelle* multiresistenti.

INDICE DEGLI AUTORI

- Abelli L.A.; 60
Adriano D.; 44; 45
Aleo A.; 24
Alio V.; 31
Amiti, S.; 64
Andreoli G.; 81
Anjum M.; 79
Arcangeli G.; 30
Are B.M.; 68
Arena S.; 5; 37; 80
Argentieri M.; 22
Aureli P.; 47
Aurigemma C.; 33
Azara A.; 68
Bacchi M.; 8
Baldari, M.; 12
Balocchini E.; 10
Bassoli O.; 40
Battista P.; 27; 67
Battista T.; 26
Battisti A.; 40; 42; 50
Bella A.; 3; 5; 19
Benedetti I.; 5; 37; 43; 72; 80
Bernardi C.; 21
Bertasi B.; 32; 58
Bianchi D.M.; 44; 45
Bianchi E.; 75
Bilei S.; 6; 15; 22; 34; 76
Binkin N.; 46
Blangiardi F.; 62
Boccia A.; 33
Boggi R.; 22
Bonanno C.; 66
Bonardi S.; 23
Boni P.; 32; 58
Bonometti E.; 32
Brindani F.; 23
Bruni G.; 27; 67
Buccella C.; 42
Buonavoglia C.; 60
Buonomini M.I.; 70
Busani L.; 49; 59
Cacciapuoti C.; 75
Camarda A.; 27; 67
Caprioli A.; 5; 19; 39; 49; 50; 51;
59; 73; 79
Caputi G.; 26
Cardamone C.; 24; 35
Carlucci D.; 28
Caroli D.; 8
Caroppo S.; 44
Carullo M.R.; 6
Cascone G.; 31
Cavallini R.; 69
Celano G.V.; 57
Cenci T.; 65
Cerci T.; 42
Cerquetti M.; 50
Chezzi C.; 60
Chiarretto G.; 25
Chironna M.; 26
Cibin V.; 6
Cibotti S.; 65
Ciofi degli Atti M.L.; 3; 5; 19
Circella E.; 27; 67
Cirillo G.; 8
Citarella A.; 28
Civera T.; 44
Cocuzza C.; 68
Colavita G.; 71

Colleo M.M.; 61
 Colonna D.; 34
 Conedera G.; 29
 Conversano M.; 26
 Corda B.; 22
 Cordaro G.; 40; 42
 Corrain C.; 30
 Corrò M.; 50; 51
 Coscia M.F.; 48
 Cosciani Cunico E.; 32
 Costa A.; 31; 35
 Croci L.; 30; 36
 D'Incau M.; 23; 67
 D'Ottavio M.C.; 47
 Dambrosio A.; 57
 Daminelli P.; 32; 58
 David M.; 45
 De Bassa A.; 40
 De Giusti M.; 33
 De Medici D.; 36
 De Santis G.; 75
 De Santis P.; 34
 De Santis, L.; 64
 De Vito D.; 48
 Debidda P.; 75
 Decastelli L.; 6; 44; 45
 Dell'Aira, E.; 64
 Dell'Aquila L.; 48
 Dettori G.; 60
 Dettori M.; 68
 Di Bartolo I.; 46
 Di Egidio A.; 40; 42
 Di Giampietro G.; 34; 76
 Di Giannatale E.; 6
 Di Matteo P.; 40; 42
 Di Noto A.M.; 24; 31; 35
 Di Pasquale S.; 36
 Dionisi A.M.; 5; 37; 38; 43; 59;
 80
 Donati V.; 40
 Ercole A.; 22
 Escher M.; 73
 Fabbi M.; 81
 Faillone M.; 75
 Fanelli I.; 53; 55
 Fasolato L.; 30
 Feltrin F.; 42
 Ferrera G.; 62
 Filetici E.; 5; 37; 38; 43; 72
 Finazzi G.; 32
 Fioravanti A.; 50; 73
 Fioravanti R.; 39; 51
 Fisichella S.; 80
 Formato, G.; 64
 Fortina G.; 44
 Fortunato A.; 48
 Fossi E.; 28
 Franco A.; 40; 42
 Frezza A.; 29
 Galetta P.; 3; 5; 8; 19; 43
 Gallina S.; 44; 45
 Gallo T.; 46
 Gaspari P.; 40
 Gattuso A.; 47
 Germinario C.; 26
 Gianfranceschi M.V.; 47
 Giasi M.N.; 48
 Gnesivo C.; 22
 Goffredo E.; 6
 Gortani C.; 29
 Grant K.; 77
 Grasso G.M.; 53; 74
 Graziani C.; 5; 39; 49; 50; 51; 59
 Griffiths M.W.; 61
 Ianzano A.; 42

Iurescia M.; 40; 42
 La Ragione R.; 79
 La Salandra G.; 57
 Labalestra I.; 81
 Lana S.; 3; 5; 19
 Lavazza A.; 27; 67
 Leone A.; 53; 55; 74; 77
 Loffredo M.; 22
 Logoluso C.; 75
 Lollai S.; 82
 Lopalco P.L.; 12
 Lorenzetti S.; 42
 Lorusso V.; 57
 Losio M.N.; 30; 32; 58
 Lovari S.; 40; 42
 Lucarelli C.; 49; 59
 Lupacchino E.; 76
 Luzzi I.; 5; 19; 22; 34; 37; 38; 43;
 49; 50; 59
 Magistrali C.; 40
 Magni A.; 75
 Magnino S.; 81
 Makela P.; 13
 Mamma C.; 24; 35; 70
 Mancin M.; 6; 25; 49
 Manfrin A.; 30
 Manunta D.; 82
 Manuppella A.; 8
 Marinelli L.; 33
 Marrocco M.G.; 34; 76
 Martella V.; 60
 Martinelli D.; 26
 Martinelli M.; 60
 Marziano M.L.; 5; 73
 Marzuillo C.; 33
 Mazzette R.; 61
 McLauchlin J.; 77
 Medici M.C.; 60
 Meloni D.; 61
 Merialdi G.; 40; 42
 Miccolupo A.; 66
 Migliore, G.; 64
 Migliorino G.; 62
 Milito, M.; 64
 Mincuzzi A.; 26
 Minelli F.; 5; 73
 Minorello C.; 25
 Mioni R.; 29; 30
 Molina M.; 8
 Mongelli R.; 26
 Morabito S.; 39; 50; 51; 79
 Mureddu A.; 61
 Muresu E.; 68
 Nastasi A.; 70
 Nicoletti P.; 70
 Nifosi D.; 24
 Normanno G.; 57; 66
 Oliveri G.; 35
 Onorati C.; 42
 Onorati R.; 40
 Orefice L.; 72
 Ortali F.; 8
 Ortenzi R.; 65
 Owczarek S.; 5; 37; 38; 43; 49; 59
 Pace C.C.; 62
 Paniconi M.; 36
 Panteghini C.; 58
 Parisi A.; 57; 66
 Parisi G.; 50
 Partecipanti alla rete Enter-net
 Italia; 43
 Pavan A.; 69
 Pavia A.; 62
 Pavoni E.; 30
 Pedarra C.; 66
 Pellissier N.; 69

Pennelli D.; 27; 67
 Piana A.; 68
 Piazzì E.; 30
 Picotto P.; 11
 Piraino C.; 6
 Piras F.; 61
 Pontello M.; 69
 Prato R.; 26
 Quaglia N.C.; 57
 Quarto M.; 26
 Reale S.; 24; 31
 Riboldi E.; 23
 Ricci A.; 6; 25; 39; 40; 42; 49; 59
 Ripabelli G.; 53; 55; 71; 74; 77
 Rizzo C.; 3; 5; 19; 48
 Rizzo G.; 48
 Romani C.; 70
 Romano A.; 28
 Rossetti E.; 30
 Rossi F.; 32
 Rotili M.; 55; 71
 Ruffini F.; 40
 Ruggeri F.; 31
 Ruggeri F.M.; 46
 Russo Alesi E.M.; 24
 Saccardin C.; 25
 Saccares, S.; 64
 Sala G.; 69
 Sallustio A.; 26
 Salmi F.; 23
 Sammarco M.L.; 53; 55; 71
 Sanavio G.; 30
 Santagada G.; 66
 Santantonio M.; 48
 Scalfaro C.; 72
 Scaramella L.; 34
 Scavia G.; 5; 19; 73
 Sciortino S.; 35
 Scuota S.; 6; 65
 Seyler T.; 3; 5; 19
 Sorbara L.; 40; 42
 Staffolani M.; 6; 8; 80
 Stenico A.; 8
 Suffredini E.; 30
 Tagliabue S.; 6; 23; 27; 67
 Tamburro M.; 71; 74
 Targhetta C.; 29
 Tasselli G.; 75
 Tilola M.; 58
 Todeschi S.; 32
 Tolli R.; 34; 76
 Tomassetti, F.; 64
 Tomei F.; 50
 Torosantucci L.; 74; 77
 Toti L.; 36
 Tozzoli R.; 39; 50; 51; 79
 Tufi D.; 33
 Valli M.B.; 80
 Vicari N.; 81
 Vidili A.; 6
 Viganò A.; 69
 Vigo P.G.; 81
 Villa L.; 59
 Virgilio S.; 82
 Vitale F.; 31
 Zanardini N.; 58
 Zavagnin P.; 25
 Zicavo A.; 65
 Ziccheddu M.; 82
 Zuliani M.; 46

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, marzo 2007 (n. 1) 4° Suppl.