



# RAPPORTI ISTISAN 15|33

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Valutazione del rischio sanitario di infezioni da agenti zoonosici attraverso prodotti vegetali ottenuti in aree ad elevata pressione zootecnica**

C. Graziani, F. Arigoni, P. Turno, D. Macchioni,  
C. Pileggi, M. Pavia, P. Veltri, F. Casalnuovo, F. Capuano,  
P. Sarnelli, I. Luzzi, L. Busani



EPIDEMIOLOGIA  
E SANITÀ PUBBLICA



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## **Valutazione del rischio sanitario di infezioni da agenti zoonosici attraverso prodotti vegetali ottenuti in aree ad elevata pressione zootecnica**

Caterina Graziani (a), Fabio Arigoni (b), Pasquale Turno (b),  
Dario Macchioni (b), Claudia Pileggi (c), Maria Pavia (c),  
Pierangelo Veltri (d), Francesco Casalinuovo (e), Federico Capuano (f),  
Paolo Sarnelli (g), Ida Luzzi (h), Luca Busani (a)

*(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento Tutela della Salute e Politiche Sanitarie, Regione Calabria, Catanzaro*

*(c) Dipartimento di Scienze della Salute, Università "Magna Graecia", Catanzaro*

*(d) Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università "Magna Graecia", Catanzaro*

*(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Catanzaro*

*(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici*

*(g) Unità Operativa Dirigenziale Prevenzione e Sanità Pubblica Veterinaria,  
Regione Campania, Napoli*

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

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**15/33**

Istituto Superiore di Sanità

**Valutazione del rischio sanitario di infezioni da agenti zoonosici attraverso prodotti vegetali ottenuti in aree ad elevata pressione zootecnica.**

Caterina Graziani, Fabio Arigoni, Pasquale Turno, Dario Macchioni, Claudia Pileggi, Maria Pavia, Pierangelo Veltri, Francesco Casalnuovo, Federico Capuano, Paolo Sarnelli, Ida Luzzi, Luca Busani  
2015, v, 98 p. Rapporti ISTISAN 15/33

Gli alimenti vegetali freschi negli ultimi anni hanno assunto rilevanza quali fonte di infezioni da patogeni enterici per l'uomo. Nel caso di patogeni che hanno come serbatoio gli animali, la contaminazione può verificarsi attraverso l'utilizzo in agricoltura dei reflui zootecnici. Questo può causare la diffusione di microrganismi patogeni nel terreno, l'inquinamento di acque superficiali e profonde e, di conseguenza, la contaminazione dei prodotti vegetali. In questo rapporto è descritto lo sviluppo di un modello di valutazione integrata del rischio di esposizione dell'uomo a patogeni enterici attraverso la filiera agro-zootecnica e l'ambiente. Il modello concettuale considerato include gli insediamenti zootecnici quali possibili serbatoi di agenti patogeni, l'ambiente quale collettore degli agenti patogeni provenienti dagli allevamenti e le produzioni agricole vegetali quale potenziale veicolo di infezione per l'uomo. Lo studio è stato svolto nelle regioni Calabria e Campania, grazie ad un finanziamento del Ministero della Salute.

*Parole chiave:* Zoonosi; Patogeni enterici; Vegetali; Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

**Risk assessment of zoonotic infections due to consumption of fresh produce grown in areas with high livestock density.**

Caterina Graziani, Fabio Arigoni, Pasquale Turno, Dario Macchioni, Claudia Pileggi, Maria Pavia, Pierangelo Veltri, Francesco Casalnuovo, Federico Capuano, Paolo Sarnelli, Ida Luzzi, Luca Busani  
2015, v, 98 p. Rapporti ISTISAN 15/33 (in Italian)

In the last years fresh produce has gained attention as a source of enteric pathogens' infections to humans. In the case of pathogens that have animal reservoirs, the contamination may occur through the use in agriculture of livestock sewage. This can cause the contamination by pathogenic microorganisms of the soil and water sources and, consequently, the contamination of produce. This report describes the development of a model of integrated risk assessment of human exposure to enteric pathogens through the agricultural and farming system, and the environment. The conceptual model considered includes farms as potential reservoirs of pathogens, the environment as a collector of pathogens from the farms and fresh produce as a potential vehicle of human infection. The study was carried out in Calabria and Campania regions, with the support of the Italian Ministry of Health.

*Key words:* Zoonosis; Enteric pathogens; Vegetables; Risk assessment

Per informazioni su questo documento scrivere a: [caterina.graziani@iss.it](mailto:caterina.graziani@iss.it)

Progetto realizzato con il supporto finanziario del Ministero della Salute – CCM 2012/604.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Graziani C, Arigoni F, Turno P, Macchioni D, Pileggi C, Pavia M, Veltri P, Casalnuovo F, Capuano F, Sarnelli P, Luzzi I, Busani L. *Valutazione del rischio sanitario di infezioni da agenti zoonosici attraverso prodotti vegetali ottenuti in aree ad elevata pressione zootecnica*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/33).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*  
Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



## **ISTITUZIONI *partecipanti allo studio***

---

### **Regione Calabria**

#### *Dipartimento Tutela della Salute e Politiche Sanitarie*

Responsabile scientifico: Fabio Arigoni, Pasquale Turno, Dario Macchioni,

Collaboratori: Giacomo Brancati, Rubens Curia

Collaboratori amministrativi: Michele Rossano, Marcella Mauro, Nicola Lupia, Antonio Scordamaglia

### **Regione Campania**

#### *Settore Veterinario*

Responsabile Unità Operativa: Paolo Sarnelli

### **Università “Magna Graecia” di Catanzaro**

#### *Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche*

Responsabile Unità Operativa: Pierangelo Veltri

Collaboratori: Giuseppe Tradigo, Carmine Pagliaro, Marco Oliverio

#### *Dipartimento di Scienze della Salute*

Responsabile Unità Operativa: Maria Pavia

Collaboratori: Claudia Pileggi, Maria Crinò, Aida Bianco, Carmelo Nobile

### **Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno**

#### *Portici*

Responsabile Unità Operativa: Federico Capuano

Collaboratori: Yolande Therese Rose Proroga, Maria Rosaria Carullo,  
Immacolata La Tela, Andrea Mancusi

#### *Catanzaro*

Responsabile Unità Operativa: Francesco Casalnuovo

Collaboratori: Antonio Cacia, Paola Rippa, Lucia Ciabrone, Monica Corea, Maria Caroli,  
Saverio Cortese, Rosanna Musarella, Cristina Mollura, Annamaria Cristofaro

### **Istituto Superiore di Sanità**

#### *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

Responsabile Unità Operativa: Caterina Graziani

Collaboratori: Luca Busani

#### *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate*

Collaboratori: Ida Luzzi, Anna Maria Dionisi, Sergio Arena, Ildo Benedetti, Slawomir Owczarek

## **ISTITUZIONI *collaboranti allo studio, per provincia***

---

### **Catanzaro**

#### *Campioni umani*

Azienda Ospedaliera Mater Domini: Alfredo Focà, Rossana Puccio

Azienda Ospedaliera Pugliese Ciaccio: Rosanna Masciari

Laboratorio Armogida: Giuseppe Armogida

Laboratorio Barillaro: Rosario Crea

Laboratorio Biomedica: Anna Bressi

Laboratorio Matozzo: Francesco Matozzo

Poliambulatorio Lametino: Maria Teresa Germinara

Presidio Ospedaliero di Lamezia Terme: Rosa Anna Leone, Salvatore Nisticò, Enza Caruso

Presidio Ospedaliero di Soverato: Mimmo Donato, Donatella Scuteri

Presidio Ospedaliero di Soveria Mannelli: Ivan Potente

## **Cosenza**

### *Campioni umani*

Azienda Ospedaliera Annunziata: Cristina Giraldi  
Biodiagnostica: Carmela Milano  
Casa di cura Cascini: Giuseppe Avolicino  
Centro Diagnostico S. Nilo: Annamaria Parise  
Centro diagnostico Sybaris: Rosina Tirone  
Diagnostica Medica Coscarella: Fabio Coscarella  
Istituto Tricarico: Maria Francesca Bianco  
LABMONACO: Giovanni Monaco  
Laboratorio Analysis Center: Francesco Sarubbi  
Laboratorio Bilotta: Maria Carmela Bilotta  
Laboratorio Biocenter: Salvatore Di Nardo  
Laboratorio Biocontrol Check-up: Emanuela De Marco  
Laboratorio Biolab: Maria Clorinda Aronna  
Laboratorio Biomedical: Maria Concetta Rummolo  
Laboratorio Bios: Patrizia Marrelli  
Laboratorio Borzi: Domenico Borzi  
Laboratorio Centro Jonico: Vincenzo Ippolito  
Laboratorio Cosentino: Natalino Cosentino  
Laboratorio De Pietro: Francesco De Pietro  
Laboratorio Di Donna: Paolo Di Donna  
Laboratorio F.lli Luca: Teresa Luca  
Laboratorio Gamma: Beatrice Valente  
Laboratorio Ippolito: Gabriella Capparelli  
Laboratorio Leporace: Ivana Benvenuti  
Laboratorio Lusal: Angela Argirò  
Laboratorio Medical: Laurie-Lynn Carelli  
Laboratorio Miceli: Francesco Miceli  
Laboratorio Nicastro: Giancarlo Nicastro  
Laboratorio Nitti: Giulia Rossi  
Laboratorio Perugini: Anna Perugini  
Laboratorio Politano/loizzo: Maria Grazia Dielsi  
Laboratorio Ricci: Elisabetta Pulerà  
Laboratorio Salimbeni – Versace: Francesco Salimbeni  
Laboratorio Salimbeni: Francesco Salimbeni  
Laboratorio Salus: Sergio Gravina  
Laboratorio Serio: Anna Maria Serio  
Laboratorio Vercillo: Marina Vercillo  
Presidio Ospedaliero di Acri: Anna Ceraldi, Michele Fusaro  
Presidio Ospedaliero di Castrovillari: Giovanni Gigliotti, Rossella Maltese  
Presidio Ospedaliero di Cetraro: Adele Taranto  
Presidio Ospedaliero di Lungro: Titta Bonifati  
Presidio Ospedaliero di Praia a Mare: Francesca Massara, Raffaele Diana  
Presidio Ospedaliero di Rogliano: Teresa Spataro  
Presidio Ospedaliero di Rossano: Pasquale Paletta, Maria Lucia Petrelli, Luigi Mariano  
Presidio Ospedaliero di San Francesco di Paola: Marinella Zacchi, Maria Maddalena Grossi  
Presidio Ospedaliero di San Giovanni in Fiore: Amalfitano, Francesca Orrico  
Presidio Ospedaliero di San Marco Argentano: Antonio Damis  
Presidio Ospedaliero di Trebisacce: Elisabetta Grillo

### *Campioni animali e vegetali*

Azienda Sanitaria Provinciale di Cosenza: Anna Maria Ciardullo, Corrado Dattoli, Francesco Franco,  
Salvatore Antonio Manfredi, Roberta Talone, Antonio Troisi

## **Crotone**

### *Campioni umani*

Azienda Ospedaliera di Crotone: Rita Cizza  
Laboratorio Altomari: Maria Bonpignano  
Laboratorio Biolav: Salvatore Valente  
Laboratorio Bios: Fortunata Salvemini  
Laboratorio Dott. Rodio: Gaetano Patarino  
Laboratorio Fleming: Oreste Antonio Setti  
Laboratorio Morrone: Teresa *Primerano*  
Laboratorio Pasteur: Giovanni Ierardi  
Laboratorio Riillo: Pasquale Riillo  
Laboratorio Via: Salvatore Cimieri  
Laboratorio Volante: Antonietta Rizzo

### *Campioni animali e vegetali*

Azienda Sanitaria Provinciale di Crotone: Maria Caterina Figliuzzi, Giuseppe Ierardi, Saverio Spadafora, Carmelo Salviati

## **Reggio Calabria**

### *Campioni umani*

Azienda Ospedaliera Melacrino-Morelli: Angelo Barbaro  
Centro Diagnostico Gamma: Vincenzo Macino  
Istituto GMM: Antonio Messina  
Laboratorio Alfa Bianco: Maria Giuseppina Strati  
Laboratorio Antico: Alfredo Antico  
Laboratorio Barreca: Giorgio Barreca  
Laboratorio Caruso: Antonio Caruso  
Laboratorio Cavaliere: Francesco Cavaliere  
Laboratorio Clinical Control: Vanessa Cribari  
Laboratorio De Blasi: Antonia Malara  
Laboratorio Europa: Alfio Palazzolo  
Laboratorio IDEA: Giuseppe De Angelis  
Laboratorio LAC: Domenico Fotia, Ferdinando Maringola  
Laboratorio Libri: Fortunato Libri  
Laboratorio Minerva: Maria Campise  
Laboratorio Pasteur: Daniela Ricioppo  
Laboratorio Richichi: Roberto Richichi  
Laboratorio S. Antonio: Antonino Laurendi  
Laboratorio Saladino: Rocco Tassone  
Laboratorio Salus: Francesco Mobrìci  
Laboratorio San Rocco: Giuseppe Santoro  
Laboratorio Sant'Anna: Massimo Saiaci  
Laboratorio Serranò: Francesco Serranò  
Laboratorio Simef: Stefano Votanòl  
Laboratorio Siracusa: Francesco Siracusa  
Laboratorio Tassone: Rocco Tassone  
Laboratorio Zoccali: De Salvo  
Poliambulatorio Specialistico: Rosita Murdocca  
Poliambulatorio Ventra: Giuseppe Ventra  
Polidiagnostica Meridionale: Gregorio Greco  
Presidio Ospedaliero di Locri: Antonella Rodinò  
Presidio Ospedaliero di Melito Porto Salvo: Ferdinando Familiari  
Presidio Ospedaliero di Polistena: Girolamo Cangemi, Alfredo Rosselli  
Presidio Ospedaliero di Scilla: Serafina Rullo, Francesca Aromato

**Vibo Valentia***Campioni umani*

Laboratorio Biomedical: Pino Lo Iacono

Laboratorio Nusdeo: Sergio Pacetti

Laboratorio Salus: Vincenzo Mangialavori

Presidio Ospedaliero di Tropea: Michele Cutellè

Presidio Ospedaliero di Vibo Valentia: Enzo Majolo, Tito Rodà



# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>Attività svolta in Calabria</b> .....	4
Studio su animali, vegetali e ambiente .....	4
Individuazione aree di studio.....	4
Campionamenti .....	4
Attività analitica .....	8
Risultati .....	8
Gestione delle informazioni e dei dati su piattaforma online dedicata .....	12
Studio nel settore medico.....	17
Attivazione di un sistema di sorveglianza .....	17
Raccolta dei ceppi di <i>Salmonella</i> spp. e analisi dei dati .....	20
<b>Attività svolta in Campania</b> .....	27
Studio su animali, vegetali e ambiente .....	27
Definizione delle aree di studio.....	27
Campionamenti .....	31
Risultati .....	35
Studio nel settore medico.....	43
Raccolta dei ceppi di <i>Salmonella</i> spp. e analisi dei dati .....	43
<b>Conclusioni</b> .....	48
<b>Bibliografia di riferimento</b> .....	50
<b>Appendice A.</b> Metodi di tipizzazione di <i>Salmonella</i> spp.....	53
<b>Appendice B.</b> Metodo di rilevamento di <i>Salmonella</i> spp. tramite PCR in Real-Time .....	61
<b>Appendice C.</b> Metodi di identificazione di <i>E.coli</i> patogeni in campioni di origine animale, da alimenti e da ambiente .....	67
<b>Appendice D.</b> Indicatori per la valutazione della qualità del sistema di sorveglianza dei casi umani di infezione da <i>Salmonella</i> spp. ....	73
<b>Appendice E.</b> Scheda di accompagnamento del campione .....	79
<b>Appendice F.</b> Scheda di rilevazione.....	83
<b>Appendice G.</b> Scheda di rilevazione (<18 anni).....	89
<b>Appendice H.</b> Informativa per il paziente.....	95



## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, la promozione di stili di vita e abitudini alimentari più sane hanno portato ad un aumento della domanda di prodotti freschi. Per venire incontro a questa richiesta si è avuto un aumento delle produzioni agricole domestiche e un miglioramento del prodotto finale con il prolungamento del suo tempo di commercializzazione (*shelf life*). Per contro, il consumo di alimenti vegetali freschi pone anche un serio problema di Sanità Pubblica a causa del rischio di contaminazione degli stessi da parte di agenti patogeni come *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. I recenti e gravi episodi di tossinfezioni alimentare verificatisi anche in Europa in seguito al consumo di prodotti vegetali e ortofrutticoli hanno richiamato alla necessità di rivedere la politica dei controlli sulle derrate vegetali e soprattutto alla necessità di contenere il rischio biologico per la salute umana derivante dal loro consumo.

La contaminazione di un vegetale può avvenire in qualsiasi momento lungo l'intera filiera che va dalla produzione primaria, alla trasformazione e distribuzione. Nel caso di patogeni che hanno come serbatoio gli animali, ad esempio le salmonelle, la contaminazione del terreno può verificarsi attraverso l'utilizzo di letame contaminato, in particolare, in caso gli escrementi provengano da animali allevati in maniera intensiva.

Salmonelle ed *E. coli* STEC possono, attraverso il letame contaminato, legarsi alla superficie dei vegetali coltivati dove possono sopravvivere e replicarsi.

Il letame e, più in generale i reflui delle aziende zootecniche (liquami), vengono smaltiti in agricoltura, in quanto rappresentano un buon ammendante per il terreno e una preziosa fonte di sostanze fertilizzanti per le colture. Tale uso viene particolarmente incentivato nelle aziende agricole "miste", con allevamento di animali e produzione orticola, che ricorrono alla concimazione organica provenienti dalle deiezioni animali. Tuttavia, se tale utilizzo non è correttamente gestito e controllato, si possono generare inconvenienti, quali la diffusione di microrganismi patogeni, l'inquinamento di falde acquifere superficiali e profonde e altre problematiche ambientali (cattivi odori, infestazioni da insetti). Questi aspetti sono collegati alla presenza e densità degli insediamenti zootecnici sul territorio, alla tipologia degli stessi e alle specie allevate, oltre che allo stato sanitario degli allevamenti e alla presenza e diffusione degli agenti zoonosici negli stessi.

Si può quindi considerare un modello ambientale che include gli insediamenti zootecnici quali possibili serbatoi di agenti patogeni, l'ambiente (terreno e acqua) quale collettore degli agenti patogeni provenienti dagli allevamenti e le produzioni agricole vegetali contaminate quale veicolo di infezione per l'uomo.

Ad oggi non ci sono studi che definiscono il rischio di circolazione di agenti zoonosici tra animali, ambiente e alimenti di origine vegetale in aree di produzione agricola e zootecnica, e il complesso modello di rischio sanitario richiede un approccio basato su strumenti e conoscenze integrate di analisi.

Nel sud d'Italia il numero di occupati in agricoltura è circa la metà (456.000 unità) del totale nazionale (924.000 dati ISTAT 2008), indicando come in queste aree la produzione agricola rivesta un ruolo importante nell'economia regionale.

Le Regioni Campania e Calabria hanno aree a vocazione produttiva agricola e zootecnica, ed entrambe le regioni hanno produzioni vegetali destinate sia al mercato locale/nazionale che all'esportazione (la Campania contribuisce alla bilancia agroalimentare nazionale per il 5,3% delle importazioni e per l'8,3% delle esportazioni, ISTAT 2008).

La valutazione del rischio di contaminazione di prodotti vegetali da agenti patogeni zoonosici è quindi uno strumento essenziale per la protezione del consumatore e per la promozione delle produzioni agricole.

A questo proposito il Centro di prevenzione e Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute ha finanziato un progetto (dal titolo “Valutazione del rischio sanitario di infezioni da agenti zoonosici attraverso prodotti vegetali ottenuti in aree ad elevata pressione zootecnica”, n. 2012/604) che ha visto le regioni Calabria e Campania coinvolte nello sviluppo di un modello di valutazione integrata del rischio di esposizione della popolazione a patogeni enterici attraverso la filiera agro-zootecnica e l’ambiente.

Lo scopo del progetto è stato valutare il rischio di infezione per l’uomo da agenti patogeni zoonosici in seguito al consumo di alimenti vegetali ortofrutticoli prodotti in aree ad elevata esposizione alla contaminazione microbica diretta o indiretta (attraverso bacini idrici che forniscono acqua utilizzata in agricoltura e a rischio di contaminazione da reflui zootecnici, o altre particolari attività produttive) derivante da insediamenti zootecnici intensivi.

Gli obiettivi del progetto sono stati:

1. definire e implementare modelli epidemiologici di controllo del territorio, in aree delle regioni Calabria e Campania a maggior rischio sanitario di natura ambientale e derivante dalle attività produttive primarie zootecniche;
2. isolare e caratterizzare ceppi di *Salmonella enterica* circolanti nelle aree a rischio e potenziali responsabili di infezioni zoonosiche conseguenti alla contaminazione delle produzioni alimentari primarie di origine animale e vegetale;
3. valutare il rischio sanitario e quindi della sicurezza alimentare nelle aree territoriali a forte pressione ambientale; proposta di misure d’intervento per il contenimento del rischio e divulgazione dei risultati ottenuti.

Il progetto si è svolto attraverso l’attività di unità operative afferenti alle seguenti istituzioni:

– *Regione Calabria*

- Dipartimento Tutela della Salute e Politiche Sanitarie

Ha svolto il ruolo di coordinamento generale del progetto e della gestione dei rapporti con il Ministero della Salute. Ha collaborato inoltre nella selezione delle aree di interesse e organizzato i campionamenti negli allevamenti agro-zootecnici in Calabria. Si è inoltre occupata dell’organizzazione della riunione scientifica di chiusura del progetto.

– *Regione Campania*

- Settore Veterinario

Ha svolto attività di co-coordinamento scientifico del progetto per le attività effettuate nella Regione Campania ed ha collaborato nell’individuazione delle aree geografiche e nella raccolta delle informazioni degli allevamenti e delle aree di produzione attraverso l’Osservatorio Regionale per la Sicurezza Alimentare (ORSA).

– *Università Magna Graecia di Catanzaro*

- Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

Ha strutturato il modello per la raccolta, gestione e analisi dei dati prodotti nel corso delle attività di progetto e l’integrazione del modello di dati con layer geografici di interesse in sistemi cartografici open source.

- Dipartimento di Scienze della Salute

Ha attivato un sistema di sorveglianza nella Regione Calabria volto principalmente all’identificazione dei casi umani di infezione da *Salmonella* spp. e la raccolta di

informazioni per studi epidemiologici. In questa attività ha coinvolto strutture diagnostiche territoriale e ospedaliere in tutta la regione consentendo la costituzione di una collezione di ceppi di *Salmonella* da casi umani che sono stati successivamente tipizzati con differenti metodiche.

- *Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Mezzogiorno*
  - Catanzaro  
Ha collaborato nell'individuazione delle aree geografiche considerate e si è occupata dell'esecuzione delle prove analitiche, di isolamento e identificazione di *Salmonella* ed *E.coli* enteropatogeni nei campioni provenienti da varie origini in Calabria.
  - Portici  
Ha collaborato nell'individuazione delle aree geografiche considerate nel progetto e si è occupata dell'esecuzione delle prove analitiche, di isolamento e identificazione di *Salmonella* nei campioni provenienti da varie origini in Campania. Tale Istituto inoltre in qualità di laboratorio di riferimento della regione Campania per la rete EnterNet si è occupato della raccolta degli isolati da casi umani di *Salmonella* e della loro tipizzazione.
- *Istituto Superiore di Sanità (ISS)*
  - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare  
(in collaborazione con il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate)  
Si è occupato della caratterizzazione molecolare degli isolati delle collezioni della Regione Calabria e Campania attraverso Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE). Inoltre ha contribuito all'analisi dei dati e alla valutazione del rischio studiando in particolare il contributo delle varie fonti d'infezione e il ruolo dei vegetali quale potenziale fonte di infezione nelle aree a rischio.

Le attività progettuali sono state svolte in modo differente nelle due regioni in quanto la realtà territoriale e produttiva e il livello di conoscenza della problematica differiva tra le due regioni. Ulteriori dettagli sulle attività svolte singolarmente in Calabria e Campania sono fornite nei capitoli specifici.

## ATTIVITÀ SVOLTA IN CALABRIA

### Studio su animali, vegetali e ambiente

#### Individuazione aree di studio

La prima fase del progetto ha previsto la suddivisione dell'area di studio in due zone, distinte per il numero di allevamenti. Attraverso la Banca Dati Nazionale degli insediamenti zootecnici, si sono ottenuti dati di numerosità di allevamenti per comune. Si sono selezionati con criteri di convenienza i comuni e si è provveduto a suddividerli tra comuni ad alta e bassa densità considerando una soglia di trenta allevamenti sul territorio (Tabella 1).

**Tabella 1. Comuni ad alta e bassa densità zootecnica considerati**

Comune	Densità di allevamenti	N. aziende campionate
Scalea	Bassa	2
Caraffa del Bianco	Bassa	1
S. Benedetto Ullano	Bassa	1
San Sosti	Bassa	1
Roccabernarda	Bassa	3
Brancaleone	Bassa	1
Tarsia	Bassa	1
S. Lorenzo del Vallo	Bassa	1
Soveria Simeri	Bassa	1
Casabona	Bassa	1
Roggiano Gravina	Bassa	2
Cotronei	Bassa	1
Crotone	Bassa	2
Catanzaro	Bassa	1
Corigliano	Alta	1
San Lorenzo	Alta	1
Fuscaldo	Alta	1
Lamezia terme	Alta	1
S. Marco Argentano	Alta	7
Castrovillari	Alta	2

Ulteriori criteri di selezione sono stati produzioni agricole e zootecniche nello stesso allevamento e consistenza (numerosità degli animali in allevamento), definita considerando una soglia di 80 animali/allevamento (Figura 1).

#### Campionamenti

Dopo l'individuazione delle aziende sono stati definiti sia il numero di campioni di differenti matrici e da differenti fonti (animali, vegetali, ambiente-acque superficiali) sia i tempi di prelievo. Con ambiente si intendono acque di scolo e acque presenti in canali in prossimità delle aziende. Nello specifico si è cercato di effettuare per ciascuna azienda due prelievi al mese delle varie matrici come evidenziato in Tabella 2-5. Per quanto riguarda le aziende agricole sono stati effettuati campionamenti considerando i prodotti vegetali disponibili nel periodo in considerazione.

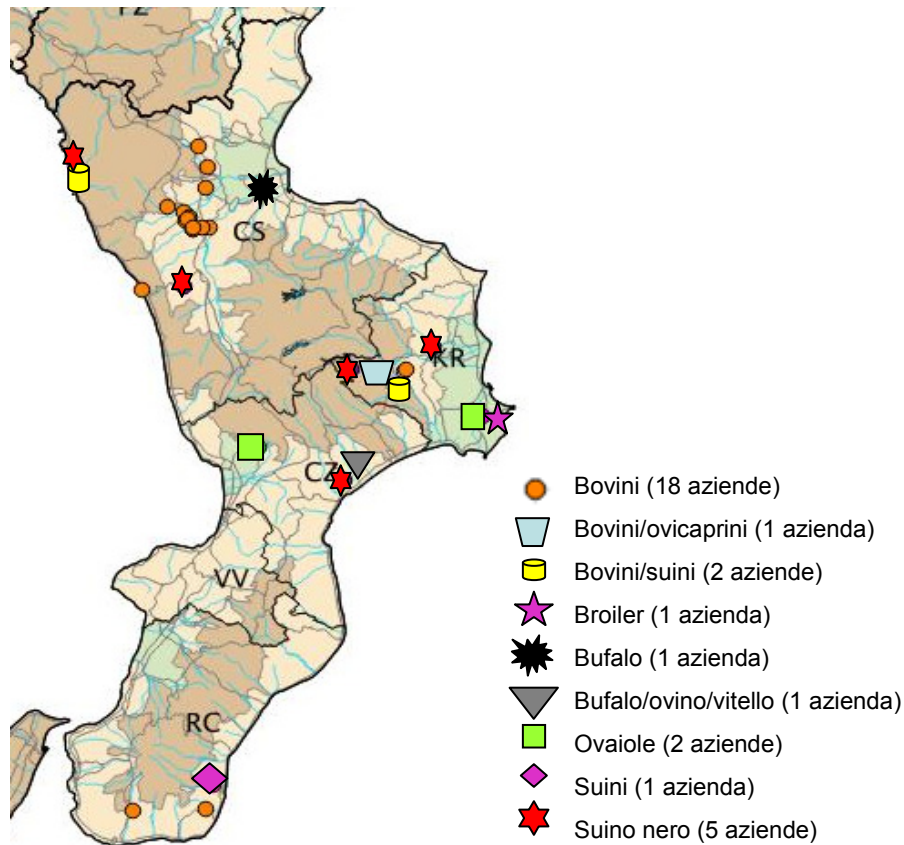


Figura 1. Distribuzione spaziale delle aziende incluse nello studio distinte per specie animale

Tabella 2. Campioni (n.) effettuati negli allevamenti considerando le diverse matrici

Az.	Densità zootecnica*	Specie animale tipo	n.	Acque			Feci	Liquami	Polveri	Lucertola	Anfibi
				A	I	S					
1	Alta	Bufali	29	8			19	2			
2	Bassa	Bovini/suini	38	14			19	5			
3	Alta	Bovini	28	11			15	2			
4	Alta	Bovini	112	24			51	25	12		
5	Bassa	Bovini/ovicapriani	27	8			14			1	4
6	Bassa	Bovini	21	8			12		1		
7	Bassa	Suini	9			3	2	4			
8	Alta	Bovini	4	2			1	1			
9	Bassa	Bovini	6	3			2	1			
10	Bassa	Suini neri	4	1			3				
11	Bassa	Suini neri	4				4				
12	Bassa	Suini neri	5	1			4				
13	Bassa	Suini neri	2	1			1				
14	Bassa	Bufali/pecore/vitelli	6				6				
15	Bassa	Ovaiole	12	3			9				
16	Bassa	Broiler	9	3			6				

segue

continua

Az.	Densità zootecnica*	Specie animale tipo	Acque			Feci	Liquami	Polveri	Lucertola	Anfibi	
			n.	A	I						S
17	Bassa	Bovini/suini	14	4		10					
18	Bassa	Suini neri	5	2		2	1				
19	Alta	Ovaiole	2	1		1					
20	Bassa	Bovini	9	2	1	4	2				
21	Bassa	Bovini	8	2		4	2				
22	Alta	Bovini	4	1		2	1				
23	Bassa	Bovini	8	2		4	2				
24	Alta	Bovini	4	1		2	1				
25	Bassa	Bovini	4	1		2	1				
26	Alta	Bovini	8	2		4	2				
27	Alta	Bovini	4	1		2	1				
28	Bassa	Bovini	8	2		4	2				
29	Alta	Bovini	4	1		2	1				
30	Alta	Bovini	4	1		2	1				
31	Alta	Bovini	4	1		2	1				
32	Alta	Bovini	4	1		2	1				
<b>Tot.</b>			<b>410</b>	<b>112</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>217</b>	<b>59</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

\* Densità zootecnica del territorio: alta, > 80 capi; bassa, < 80 capi; A: abbeveraggio; I: irrigazione; S: scolo

**Tabella 3. Campioni (n.) vegetali effettuati nelle aziende agricole**

Azienda	Fonte di irrigazione	Tipo di produzione	N. campioni totali
Az. 1	potabile, pozzo	misto	9
Az. 2	potabile, pozzo	misto	10
Az. 3	acque superficiali	ortaggi	9
Az. 4	potabile, pozzo	misto	59
Az. 5	acque superficiali	ortaggi	39
Az. 6	acque superficiali	ortaggi	22
Az. 7	pozzo, acque superficiali	ortaggi	8
Az. 8	acqua piovana, acqua di scolo	selvatici	2
Az. 9	acqua piovana, acqua di scolo	selvatici	1
Az. 10	potabile	ortaggi	1
Az. 11	potabile	ortaggi	4
Az. 12	potabile	ortaggi	3
Az. 13	potabile, pozzo	ortaggi	4
Az. 14	potabile	ortaggi	7
Az. 15	sorgente della Sila	ortaggi	7
Az. 16	sorgente della Sila/pozzo	ortaggi	4
Az. 17	potabile, pozzo	ortaggi	31
Az. 19	potabile, pozzo	ortaggi	6
Az. 20	vasca sorgente	ortaggi	12
Az. 21	potabile, pozzo	ortaggi	7
Az. 22	potabile, pozzo	ortaggi	1
Az. 23	potabile, pozzo	ortaggi	8
Az. 24	–	ortaggi	2
Az. 25	–	ortaggi	2
Az. 26	–	ortaggi	6
Az. 27	–	ortaggi	3
Az. 28	–	ortaggi	2
Az. 29	–	ortaggi	2
Az. 30	–	ortaggi	1
Az. 31	–	ortaggi	3
Az. 32	–	ortaggi	2
<b>Totale</b>			<b>277</b>



Tabella 4. Campioni (n.) per specie vegetale campionata per azienda

Campione	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Asparagi	9																															
Avena	1																															
Basilico	2	3	2		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
Bietola	1	5	2	1		2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1				
Borragine	1																															
Broccoli	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Caco	1																															
Carote	3																															
Cavolo	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Cetrioli	1	2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Cicoria	1	2	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Cipolla	1	2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Clementine	4																															
Erba medica	4	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Erba selvatica	2																															
Fave	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Fieno	1																															
Finocchio	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Fiori di zucca	4	1	2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
Indivia	1																															
Insilato di mais	3	4	2	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1			
Lattuga	16																															
Loietto	1	1	13	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Mais	1	1	3	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Melanzana	1	3		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Melone	1	2	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1	
Ortaggi	1	2		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Patate	1																															
peperoncino	1																															
Peperone	3	1	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Pesca	7																															
Piantina pomodoro	1																															
Pisello	1																															
Pisello proteico	9																															
Pomodori	1	3	2	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1	
Prezzenolo	1	2	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1	
Radicchio	1																															
Rapa	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Scarola	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Sedano	1																															
Sorbo	1																															
Triticale	1																															
Verdura	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		
Verza	1	1	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1	
Zucchine	1	2	1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1		1	

**Tabella 5. Campioni (n.) ambientali effettuati in alcune aziende agricole**

Azienda	Totali	Acqua superficiale	Tampone filtro pompa	Sedimento	Tube irrigazione	Alga
Az. 1	1	1				
Az. 4	23	23				
Az. 5	23	16	2	3	1	1
Az. 6	3	3				
Az. 8	3	3				
Az. 14	1	1				
Az. 17	7	7				
Az. 19	3	2			1	

Non sempre è stato possibile rispettare la cadenza mensile definita dal protocollo anche a causa della mancata disponibilità dei prodotti agricoli da campionare.

### Attività analitica

L'attività analitica di laboratorio, relativa alle prove microbiologiche e PCR effettuate su tutti i campioni di differenti matrici provenienti da differenti fonti (animali, vegetali, ambiente-acque superficiali), sono state condotte presso l'Unità Operativa Complessa di Microbiologia degli alimenti/Osservatorio Epidemiologico Veterinario della Sezione Zooprofilattica di Catanzaro.

Le prove microbiologiche per la ricerca di *Salmonella*, effettuate mediante metodiche ISO accreditate (ISO 6579:2002/Amd.1:2007(E) e la ISO 6579:2002(E)), comprendevano l'isolamento e l'identificazione della specie mediante sistema automatizzato (Vitek, bioMérieux) per tutti gli isolati (Appendice A); su tutti i campioni vegetali e ambientali è stata inoltre applicata anche la metodica di PCR in Real-Time (Appendice B). La ricerca di *E.coli* enteropatogeni è iniziata solo nel secondo semestre del progetto ed è stata effettuata utilizzando una metodica molecolare in PCR (Appendice C).

### Risultati

I ceppi di *Salmonella* isolati sono stati inoltre testati per identificare il sierotipo, il fagotipo, il profilo di elettroforesi in campo pulsato e il profilo di resistenza agli antibiotici (Appendice A).

Come osservato nelle tabelle precedenti sono stati effettuati un totale di 751 campioni suddivisi in 410 campioni da animali, 277 campioni da vegetali e 64 campioni da ambiente.

Su tutti i campioni dalle diverse matrici 218 sono risultati essere positivi a *Salmonella* e/o *E.coli* e 533 negativi. Nella Figura 2 è evidenziata la distribuzione dei campioni positivi e negativi per mese di campionamento. Come si può osservare i campioni positivi sono risultati maggiori nel periodo autunno-inverno.

Nella Figura 3 sono mostrati il numero di campioni positivi e negativi per origine di prelievo. Come si può osservare il numero di campioni positivi maggiore è stato riscontrato negli animali (46%) seguito dal 16% nei campioni ambientali e dal 7% nei campioni vegetali.

I campioni positivi e negativi sono stati analizzati anche considerando il patogeno riscontrato, l'origine e il mese (Figura 4).

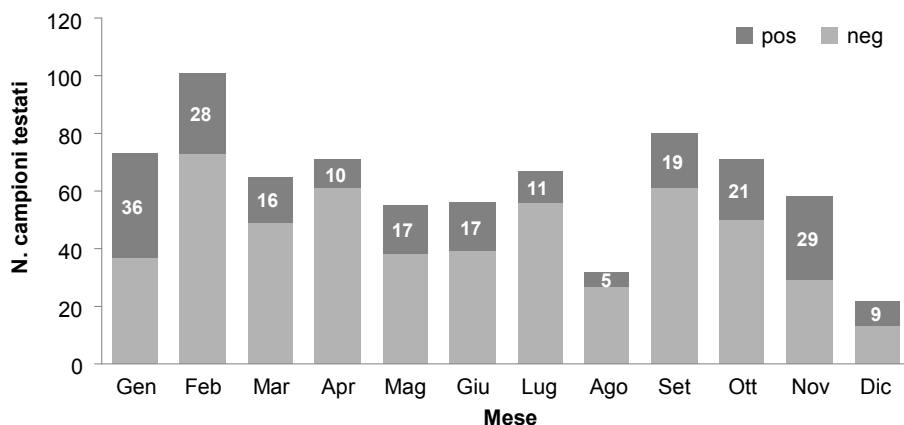


Figura 2. Distribuzione dei campioni positivi e negativi a *Salmonella* e/o *E.coli* per mese di campionamento

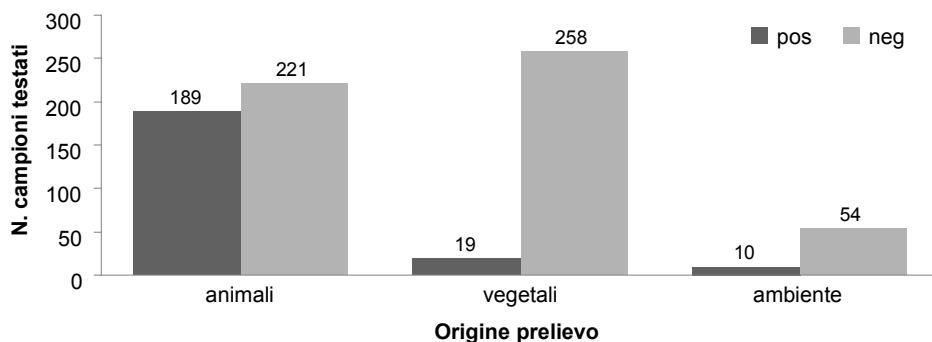


Figura 3. Numero di campioni positivi e negativi a *Salmonella* e/o *E.coli* per origine di prelievo

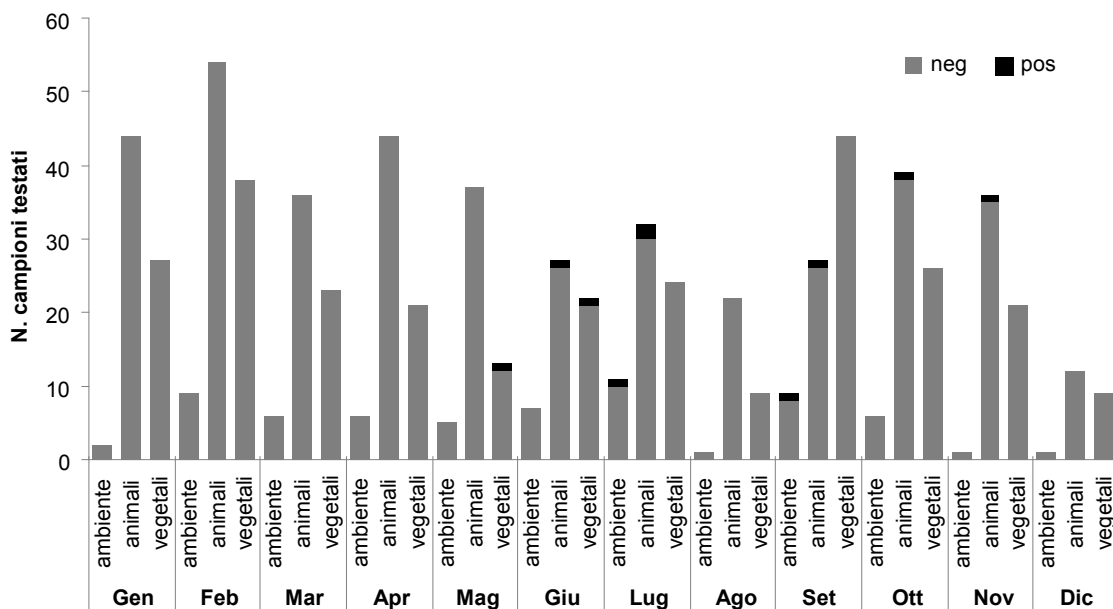


Figura 4. Numero di campioni positivi e negativi a *Salmonella* spp. per origine di prelievo e mese

Le salmonelle isolate sono state sierotipizzate al fine di identificare il sierotipo e nello specifico si è ottenuto:

- da animali:
  - 1 *Salmonella* spp. (identificata solo attraverso la metodica Real-Time quindi non sierotipizzabile per mancanza del ceppo),
  - 1 *S. Bredney*,
  - 3 *S. Napoli*;
- da vegetali:
  - 1 *S. Veneziana*,
  - 1 *S. Napoli*;
- da ambiente:
  - 1 *S. Napoli*,
  - 1 *S. Fisheruette*,
  - 1 *S. Diarizonae*,
  - 1 *S. Messina*,
  - 1 *Salmonella* spp. (solo Real-Time).

Nella Figura 5 è mostrata la distribuzione spaziale delle aziende positive e negative a *Salmonella*.

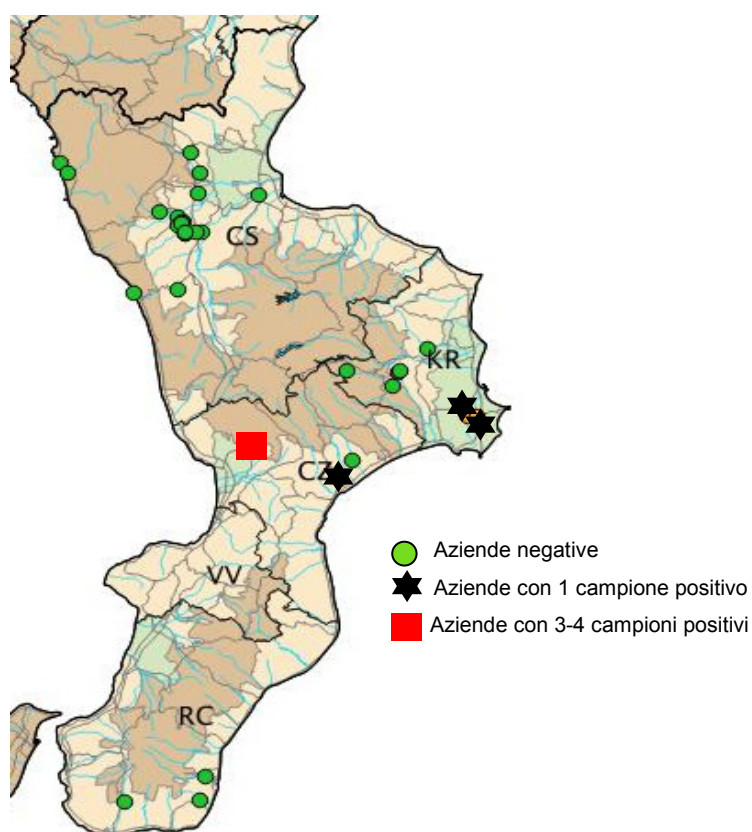


Figura 5. Distribuzione spaziale delle aziende positive e negative a *Salmonella*

Le aziende positive a *Salmonella* sono risultate essere 5 di cui tre con un solo campione positivo e 2 con 3/4 campioni positivi anche in date differenti. Le aziende positive sono state riscontrate solo nella provincia di Crotona e Catanzaro, mentre nessuna aziende positiva è stata riscontrata nella provincia di Cosenza dove il numero di aziende arruolate per il progetto è nettamente superiore alle altre provincie.

La ricerca nei campioni animali, vegetali e ambientali dell'*E.coli* è stata implementata solo nel secondo semestre del progetto e si è deciso di utilizzare oltre alla metodica ISO standardizzata, che ti consente di evidenziare la presenza generica di *E.coli*, anche una metodica molecolare in PCR (Appendice C) al fine di evidenziare la presenza di geni associati agli *E.coli* enteropatogeni. La metodica essendo stata eseguita sul campione e non sul ceppo isolato ci ha permesso di definire i geni presenti ma non di definire il patotipo specifico del ceppo.

Attraverso la metodica ISO dei 573 campioni testati 369 (64,4%) sono risultati positivi. I campioni positivi sono stati identificati prevalentemente negli animali (182) seguiti da vegetali (17) e da ambiente (4).

Nella Figura 6 sono invece descritti il numero di campioni positivi e negativi a *E.coli* enteropatogeni per origine di prelievo e mese di isolamento. Sono stati evidenziati 62/573 campioni positivi a *E.coli* enteropatogeni e di questi 43 da animali, 11 da vegetali e 8 ambientali. A differenza di *Salmonella* come si può osservare i campioni positivi ad *E.coli* indipendentemente dall'origine del prelievo sono state isolate durante l'intero anno e prevalentemente nei mesi invernali.

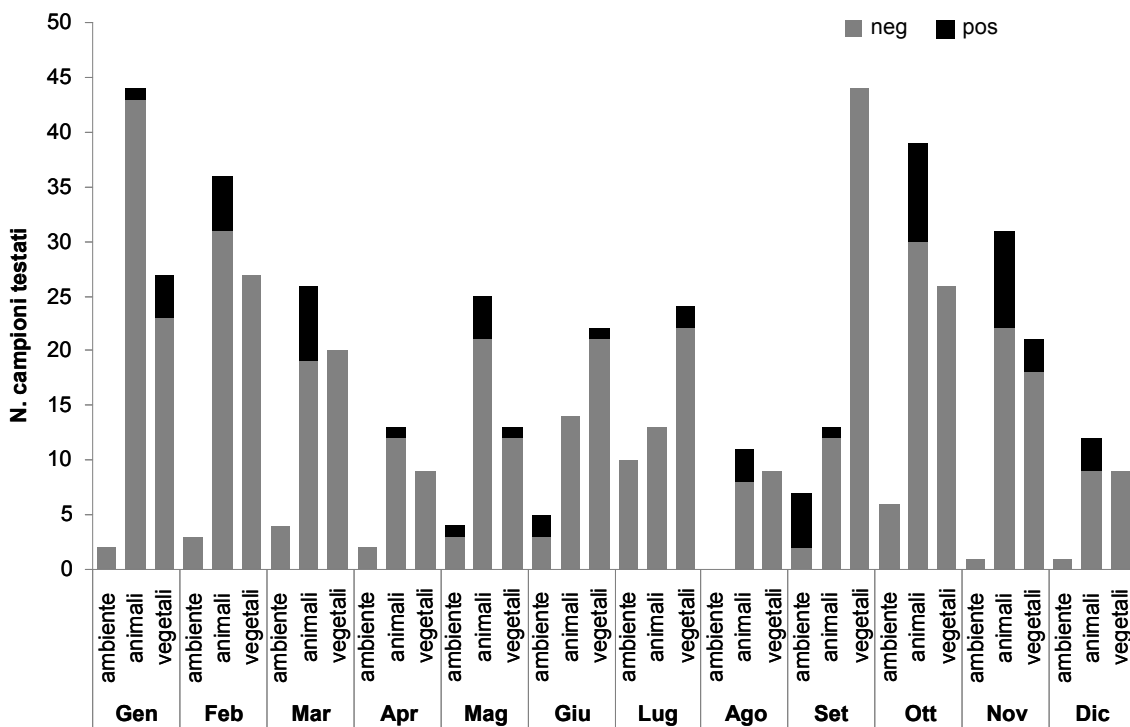


Figura 6. Campioni (n.) positivi e negativi a *E.coli* enteropatogeni per origine di prelievo e mese

Nella Figura 7 sono rappresentate le aziende risultate positive e negative a *E.coli*. Le aziende positive a *E.coli* enteropatogeni sono risultate essere 19 di cui 15 con 1-5 campioni positivi e 4 con 6-10 campioni positivi anche in date differenti. Le aziende positive sono state riscontrate in tutte le province e in particolare nelle province di Crotone e Catanzaro, dove nove aziende su dieci sono risultate positive.

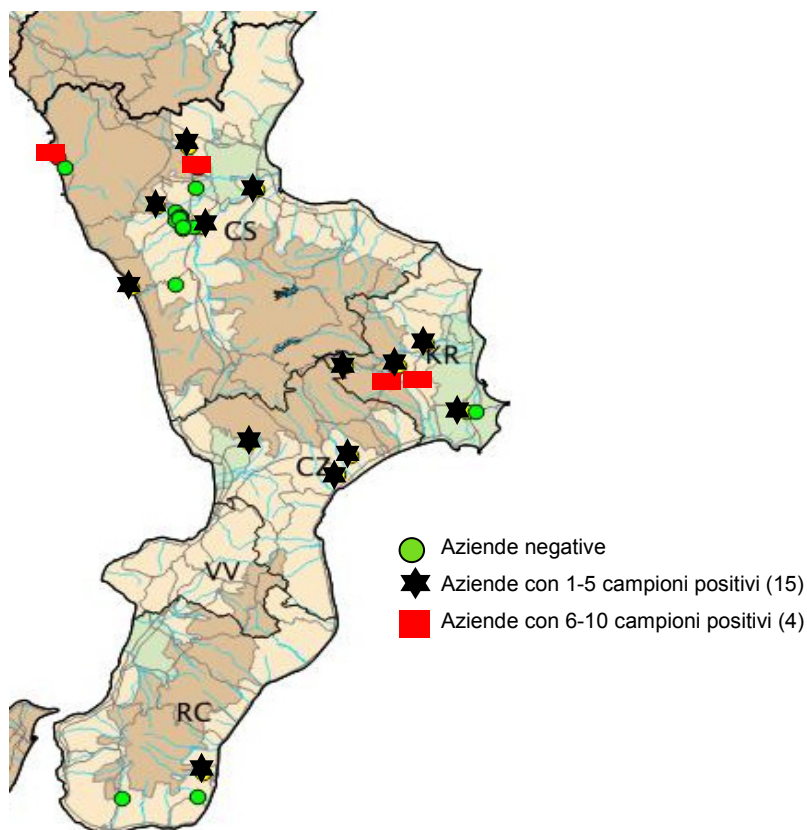


Figura 7. Distribuzione spaziale delle aziende positive e negative a *E.coli* enteropatogeni

### Gestione delle informazioni e dei dati su piattaforma online dedicata

Tutti i dati presentati nel progetto (es. dati su produzioni, campionamenti, condizioni di salute degli animali) al fine di poterli relazionare con i dati territoriali sono stati raccolti all'interno di un database open source la cui strutturazione è mostrata di seguito.

L'utilizzo di dati e di informazioni in ambito geografico rende possibile l'associazione, la correlazione e l'interrogazione di dati alfanumerici e spaziali, al fine di estrarre informazioni non immediatamente fruibili ma esistenti nei propri dataset, ottenendo quindi nuova conoscenza su relazioni spaziali o altri pattern non esplicitamente riportati nella base di dati.

Il workflow di popolamento della base di dati con i dati del progetto è stato strutturato in 3 macro-fasi, come mostrato in Figura 8.

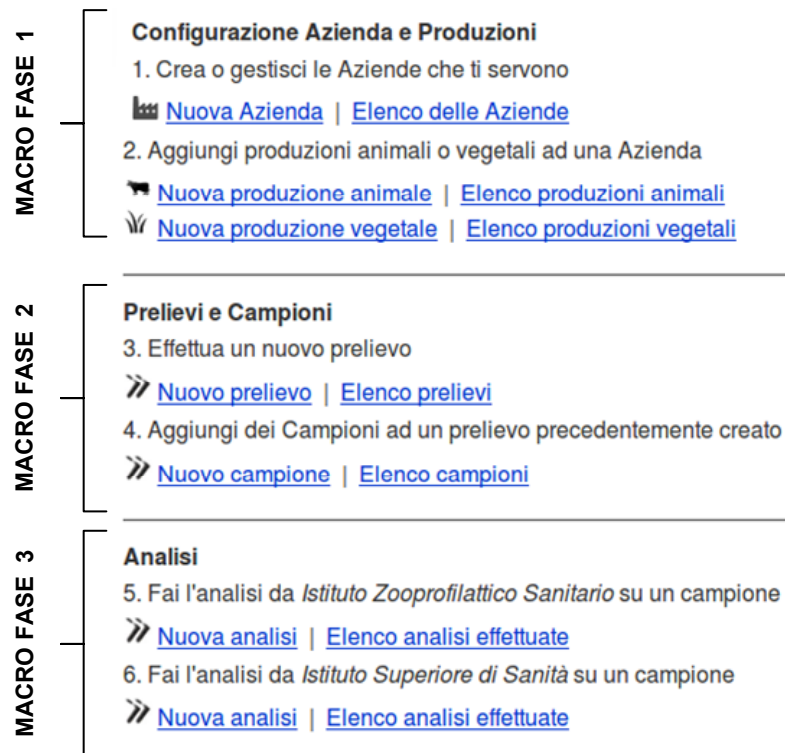


Figura 8. Schermata del workflow di popolamento dei dati

La prima fase serve al popolamento delle informazioni relative alle aziende e alle relative produzioni (Configurazione Aziende e Produzioni). Nel modello di inserimento delle aziende è stato possibile inserire i dati identificativi dell'Azienda (es. indirizzo, livello di produttività, partita IVA) e i dati della proprietà. A questo primo livello si è potuto associare sia produzioni animali (es. allevamenti in stalla, allevamenti per produzione di latte, allevamenti ai fini di macellazione) che vegetali (es. coltivazioni estensive, intensive, in serra). La seconda fase (Prelievo e Campioni) ha permesso agli operatori incaricati dei prelievi di registrare i dati relativi ai campionamenti nel sistema. A questi dati gli Istituti preposti (e partner del progetto) hanno provveduto ad associare i risultati analitici relativi. Tale fase (Analisi) è visibile solo agli operatori abilitati e solo per la porzione di loro interesse.

Le esigenze di rappresentazione delle informazioni hanno portato ad orientarsi verso il disegno di un sistema a componenti che ha potuto ospitare i dati alfanumerici e relative analisi (campionamento, valori di analisi, eventuali pattern e annotazioni) nonché i dati relativi alla rappresentazione geografica dei layer (corsi d'acqua, fiumi, posizione delle aziende e dei siti analizzati), collegati da un meccanismo di accesso web-based che ha garantito l'uso di dispositivi mobili.

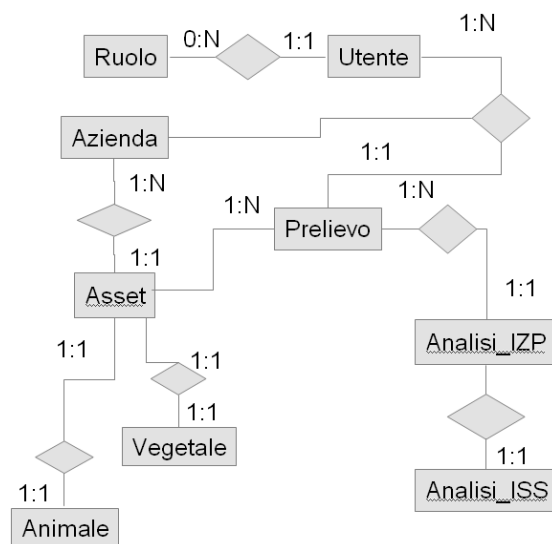
Per la memorizzazione e la rappresentazione dei dati relativi al progetto si è deciso di far riferimento ad un modello dei dati che promuovesse l'utilizzo di tecnologie open source sia per la memorizzazione e interrogazione dei dati (database) che per la loro rappresentazione su cartografia digitale (*Geographic Information System, GIS*).

Come database relazionale per la memorizzazione e la gestione dei dati si è scelto di utilizzare il sistema Postgresql. Il database Postgresql è un database relazionale votato alla gestione di dati alfanumerici tramite il linguaggio di interrogazione SQL. Per supportare operazioni con dati spaziali, il sistema può essere esteso tramite le primitive del modulo PostGIS, contenente una serie di estensioni del linguaggio SQL a supporto di dati spaziali a due e tre dimensioni di tipo puntuale, lineare, poligonale e raster.

I dati del progetto, acquisiti via web e memorizzati nella base di dati spaziale Postgres/PostGIS, sono stati visualizzati tramite il sistema QGIS (<http://qgis.osgeo.org>), un sistema informativo geografico open source per desktop, capace di elaborare e rendere i dati memorizzati su una cartografia digitale che integra anche dati provenienti da sorgenti raster eterogenee tramite i protocolli standard di interscambio dei dati spaziali WMS (*Web Mapping Service*, per dati raster), WFS (*Web Feature Service*, per dati numerici) e WCF (*Web Coverage Service*, per dati variabili nel tempo).

L'integrazione delle due tecnologie ha permesso di ottenere non solo l'acquisizione a lungo termine dei dati del progetto, ma anche per la loro interrogazione e rappresentazione, al fine di elaborare prodotti cartografici digitali (e non) che hanno descritto le relazioni fra i dati alfanumerici acquisiti e le caratteristiche proprie del territorio.

La Figura 9 mostra la struttura del database relazionale disegnato per far fronte alle specifiche del progetto.



**Figura 9. Struttura del database relazionale**

Da questo schema è stato disegnato un modello relazionale successivamente implementato in una istanza di Postgresql:

- Asset (id Az., location\*, nome asset, animali, vegetali, prelievi)
- Animale (descrizione, specie, razza, n capi, tipo allevamento, orientamento produttivo, tipo abbeveraggio id asset)
- Vegetale (descrizione, produzione, tipologia, tipo fertilizzante, fonte irrigazione, ambito commercializzazione, id asset)
- Utente (email, password, nome, cognome, data Iscrizione, data Ultimo Accesso)
- UtentiRuoli (id ruolo, id utente)
- Ruolo (nome)



- Prelievo (data, id utente, tipo prelievo, temperatura, umidità, precipitazioni, condizioni climatiche, id asset)
- Analisi\_IZS (codice iza, risultato, data, descrizione, codice isolato1 , tipo isolato1, codice isolato2, tipo isolato2, codice isolato3, tipo isolato3, codice isolato4, tipo isolato4, nome utente, id prelievo)
- Analisi\_ISS (id analisi iza, sierotipo, fagotipo, valore PFG3, valore MLVA, valore AMP, valore CTX, valore C, valore CIP, valore GM, valore K, valore NAL, valore S, valore SU, valore T, Ecoli enteropatogeni, valore EAE, patotipo, valore AGG, valore ST, valore LT, valore VTI, valore VTII, valore IPAH, nome utente).

Il Sistema di Monitoraggio Ambientale e Territoriale (SMAT) realizzato è accessibile via web utilizzando un qualsiasi browser (Figura 10). È una piattaforma progettata in HTML5 e compatibile con i dispositivi portatili e permette di creare, modificare o eliminare le aziende e/o di poterle ricercare attraverso filtri. Alle aziende vengono associati più asset ognuno dei quali permette l'attribuzione di un prelievo, un animale e un vegetale alle stesse aziende. L'asset è un'entità astratta che identifica l'azienda e l'arricchisce nelle informazioni con l'aggiunta della geolocalizzazione. Le operazioni all'interno del sistema vengono effettuate dagli utenti. Un utente è in grado di assumere uno o più ruoli, ad ogni ruolo sono connessi dei privilegi e dei limiti nell'utilizzare il sistema ovvero la possibilità di creare informazioni o di visualizzarle.

**HELP**  
Utilizzare i passi enumerati a destra, nell'ordine indicato, per inserire i dati relativi ai campionamenti.

**SMAT - Sistema di Monitoraggio Ambientale e Territoriale**  
a supporto del progetto di ricerca "Valutazione del rischio sanitario di infezioni da agenti zoonotici attraverso prodotti vegetali ottenuti in aree ad elevata pressione zootecnica", finanziato dal Ministero della Salute, di cui sono partner: Regione Calabria (Università di Catanzaro, l'Istituto Zooprofilattico di Catanzaro), Regione Campania (Istituto Zooprofilattico Portici), e l'Istituto Superiore di Sanità.

**Configurazione Azienda e Produzioni**  
1. Crea o gestisci le Aziende che ti servono  
[Nuova Azienda](#) | [Elenco delle Aziende](#)  
2. Aggiungi produzioni animali o vegetali ad una Azienda  
[Nuova produzione animale](#) | [Elenco produzioni animali](#)  
[Nuova produzione vegetale](#) | [Elenco produzioni vegetali](#)

**Prelievi e Campioni**  
3. Effettua un nuovo prelievo  
[Nuovo prelievo](#) | [Elenco prelievi](#)  
4. Aggiungi dei Campioni ad un prelievo precedentemente creato (al passo 3)  
[Nuovo campione](#) | [Elenco campioni](#)

**Analisi**  
5. Fai l'analisi da Istituto Zooprofilattico Sanitario su un campione  
[Nuova analisi](#) | [Elenco analisi effettuate](#)  
6. Fai l'analisi da Istituto Superiore di Sanità su un campione

Figura 10. Homepage del SMAT (Sistema di Monitoraggio Ambientale e Territoriale)

Ad ogni prelievo effettuato viene in seguito associata un'analisi di tipo IZS, ossia un'analisi effettuata dall'Istituto Zooprofilattico successivamente sottoposta a modifica con l'aggiunta di ulteriori analisi da parte dell'ISS. A ciascuna sezione del sistema viene associato un utente e un ruolo così come descritto di seguito:

- visitatore: visualizzazione di dati;
- admin: estende "visitatore" + creazione, modifica ogni dato del sistema;
- analisiISS: estende "visitatore" + creazione, modifica dati riguardanti l'analisi ISS;

- analisi IZS: estende “visitatore” + creazione, modifica dati riguardanti l’analisi IZS;
- vegetale: estende “visitatore” + creazione, modifica dati riguardanti la produzione vegetale;
- animale: estende “visitatore” + creazione, modifica dati riguardanti la produzione animale;
- Azienda: estende “visitatore” + creazione, modifica dati riguardanti l’Azienda, Azienda e la creazione dei relativi asset;
- User; estende “visitatore” + creazione, modifica dati riguardanti user e ruoli.

Gli utenti vengono identificati tramite e-mail e password, e ogni loro azione sul sito viene tracciata e memorizzata.

Si è inoltre implementata la correlazione tra dati alfanumerici e dati cartografici (Figura 11).

Il sistema, sviluppato su tecnologia Cloud, consente di accedere alla banca dati attraverso sistemi di gestione geografici open source. Nel caso specifico è stato utilizzato QGIS, ed è stato sviluppato un pacchetto di Plugin, chiamato “SMAT QGIS Tool” per analisi geospaziali sui dati inseriti e geolocalizzati durante le indagini.

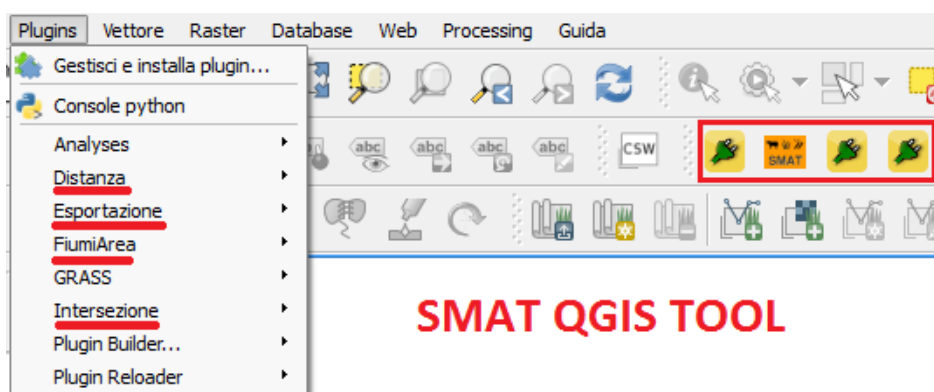


Figura 11. Sviluppo dello SMAT QGIS tool

Il *tool* è composto da quattro Plugin denominati:

- Distanza;
- Esportazione;
- FiumiArea;
- Intersezione.

Questi Plugin automatizzano il processo di esecuzione di query geospaziali. Ad esempio è possibile calcolare semplici queries in modo automatico, quali: la vicinanza tra i fiumi e aree di interesse, o l'intersezione di fonti d'acqua con zone potenzialmente inquinanti.

I Plugin sono stati scritti in codice PyQGIS, che consente d'impiegare, in fase di sviluppo, le librerie pycogp2 e csv del linguaggio Python e alcune classi della QGIS API.

Il Sistema SMAT è stato realizzato e il prototipo utilizzato consente la gestione dei dati e l'esportazione delle informazioni in formato standard (quale .csv). Il Sistema SMAT è stato realizzato e il prototipo utilizzato consente la gestione dei dati e l'esportazione delle informazioni in formato standard (quale .csv).

I dati sono importabili e accessibili utilizzando il sistema QGIS, che con un'aggiunta dei Plugin sviluppati consente di poter ottemperare all'ottenimento di informazioni utili nonché all'utilizzo di meccanismi di alert e di allarme su eventuali indicatori di interesse epidemiologico.

## Studio nel settore medico

### Attivazione di un sistema di sorveglianza

Sono di seguito riportate dettagliatamente le attività svolte sui ceppi isolati da casi umani in Calabria. Ad oggi non esistono in Calabria, a parte il Sistema Informativo delle Malattie Infettive che raccoglie solo il numero dei casi, sistemi di sorveglianza che consentono la raccolta di ceppi di *Salmonella* al fine di poter effettuare una sorveglianza di laboratorio approfondita. Tra gli obiettivi di questo progetto vi era quella di raccogliere ceppi di *Salmonella* spp. isolati dall'uomo per successive tipizzazioni e messa a confronto con gli isolati dalle altre origini. Pertanto, la prima parte ha riguardato l'attivazione di un sistema di sorveglianza nella Regione Calabria volta principalmente alla identificazione e stima dei casi umani di infezione da *Salmonella* spp.

L'attivazione è stata articolata nelle diverse fasi di seguito descritte.

- a) *Costruzione di una rete di laboratori di microbiologia per l'individuazione dei casi umani di infezione da Salmonella spp. e definizione del ruolo del centro regionale di riferimento.*

Facendo ricorso ai dati forniti dalla Regione Calabria e dalle Aziende Sanitarie Provinciali si è proceduto alla mappatura di tutti i laboratori di analisi microbiologiche delle ASP e aziende Ospedaliere e di tutti i laboratori privati accreditati della Regione Calabria. Tale ricerca ha portato alla individuazione di 104 strutture pubbliche e 141 strutture private accreditate, eleggibili per la partecipazione alla rete di sorveglianza. Ai laboratori di microbiologia che hanno aderito alla rete di sorveglianza è stato richiesto di individuare un referente con i seguenti compiti: allestimento di una coltura del ceppo isolato su piastra di terreno selettivo, in presenza di un isolamento di *Salmonella* spp. presso il laboratorio di appartenenza, compilazione di una scheda di accompagnamento del campione e comunicazione dell'avvenuto isolamento al centro di riferimento operante presso la Cattedra di Igiene del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università "Magna Graecia" di Catanzaro.

Il centro regionale di riferimento, oltre al contatto telefonico con cadenza quindicinale dei referenti dei centri periferici per verificare l'eventuale isolamento di ceppi di *Salmonella* spp., ha provveduto: a) alla raccolta e al trasporto presso il laboratorio del centro regionale di riferimento dei ceppi isolati; b) alla conferma dell'isolamento attraverso l'allestimento di prove di identificazione biochimica; c) allo stoccaggio dei ceppi al fine di costituire una collezione di ceppi di *Salmonella* spp. da casi umani; d) all'invio periodico dei ceppi isolati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Portici) per la tipizzazione sierologica dei ceppi; e) alla somministrazione dei questionari ai soggetti affetti da infezione da *Salmonella* spp. per la caratterizzazione epidemiologica dei casi.

Una volta definiti i laboratori aderenti alla rete di sorveglianza, sono stati riportati in un elenco nel quale sono stati specificati i nominativi dei referenti e i relativi contatti (telefono, cellulare, fax, e-mail).

- b) *Elaborazione degli strumenti operativi per la caratterizzazione epidemiologica dei casi umani di Salmonella spp.*

Per quanto riguarda la raccolta dei dati sui casi umani di infezione da *Salmonella* spp. sono stati approntati due strumenti operativi *ad hoc*. Il primo strumento è una semplice scheda di accompagnamento del campione orientata alla raccolta di essenziali dati

anagrafici necessari per poter contattare il caso e di dati relativi alle caratteristiche del campione (data, tipologia e motivo del prelievo) (Appendice D). Il secondo strumento elaborato (Appendice E-F-G-H) è un questionario da somministrare tramite intervista telefonica, suddiviso in sezioni per l'acquisizione di informazioni: socio-anagrafiche; cliniche, relative alla sintomatologia presentata, agli accertamenti diagnostici effettuati, al decorso clinico (con particolare attenzione alla eventuale ospedalizzazione), alle terapie farmacologiche eseguite (in particolare assunzione di antibiotici); relative agli alimenti consumati nelle 24/48 ore precedenti l'insorgenza dei sintomi e/o l'esame colturale delle feci, alla provenienza dei cibi, ai luoghi in cui erano stati consumati i pasti; relative a possibili esposizioni a ulteriori fattori di rischio, diversi dall'alimentazione, quali il contatto con animali domestici (cani, gatti, volatili), l'accesso a giardini, orti, etc., viaggi in aree a rischio.

L'intervista telefonica, effettuata dopo aver acquisito il consenso informato e l'autorizzazione al trattamento dei dati personali nel pieno rispetto del Decreto Legislativo 196/2003, era rivolta al soggetto coinvolto o, nel caso di soggetti di età <18 anni, i genitori o tutori del minore.

c) *Formazione degli operatori per la rilevazione*

Gli operatori coinvolti nell'indagine sono stati formati ed è stato successivamente valutato il grado di standardizzazione nella rilevazione dei dati.

d) *Esecuzione dello studio pilota*

È stato effettuato uno studio pilota su un piccolo campione di casi di infezione da *Salmonella* spp. verificatisi durante il I semestre di sorveglianza che ha consentito di rilevare alcune criticità in relazione alle informazioni acquisite attraverso il questionario telefonico e alla interazione con i laboratori periferici.

e) *Definizione di un set di indicatori per la valutazione della qualità del sistema di sorveglianza attivato*

f) *Archiviazione dei dati e analisi statistica dei risultati*

È stato predisposto un database informatico per l'archiviazione e la successiva analisi dei dati raccolti.

È stata, quindi, definita la metodologia ed eseguita l'analisi statistica dei dati. Un'analisi statistica descrittiva è stata condotta al fine di rappresentare le caratteristiche del campione esaminato in relazione alle variabili demografiche (età, sesso, provincia di residenza), alla sintomatologia presentata e al decorso clinico (assistenza domiciliare, ospedalizzazione), alle esposizioni a rischio (cibi e luoghi in cui gli alimenti sono stati consumati prima dell'insorgenza dei sintomi, eventuale contatto con animali domestici e accesso a giardini, etc.). Tecniche di analisi statistica univariata sono state utilizzate per valutare eventuali differenze tra diversi periodi dell'attività di sorveglianza. Sono stati, inoltre, calcolati gli *Odds Ratio* (OR) e i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%). Il livello di significatività statistica è stato fissato ad <0,05.

Un ulteriore aspetto dell'analisi statistica ha previsto il calcolo dei tassi di incidenza utilizzando come denominatore la popolazione residente al 1° gennaio 2014 avvalendosi, come fonte informativa, della banca dati demografici dell'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT).

Al fine di confrontare l'incidenza dei casi umani di infezione da *Salmonella* spp. rilevati dal sistema di sorveglianza in Calabria con il dato nazionale è stata applicata la tecnica della standardizzazione diretta. Sono stati inizialmente calcolati i tassi specifici per età e sesso utilizzando il numero di casi segnalati durante il periodo di sorveglianza e la

distribuzione per fasce di età e per sesso nella popolazione della Regione Calabria, ricavata dalla banca dati demografici dell'ISTAT e relativa al 1° gennaio 2014. Analogamente sono state ricavate le distribuzioni per fascia d'età e per sesso della popolazione italiana utilizzata come popolazione di riferimento per il calcolo dei tassi standardizzati.

Tutte le analisi sono condotte utilizzando il software statistico Stata, versione 11.

Relativamente alle caratteristiche della rete di sorveglianza, 110 laboratori sono stati inclusi (97% degli eleggibili), 25 afferivano a strutture pubbliche, mentre 85 erano laboratori privati accreditati. Sebbene rappresentassero la quota più rilevante della rete, i laboratori privati hanno segnalato solo il 7,6% dei casi di infezione da *Salmonella* spp. rilevati nel corso della sorveglianza, mentre la quota più rilevante è stata segnalata da 19 laboratori pubblici. Pertanto, confrontando il livello di partecipazione attiva delle due tipologie di laboratori aderenti alla rete, è stato del 76% per i laboratori pubblici e del 6% per i laboratori privati accreditati. Per quel che riguarda, poi, le segnalazioni effettuate dai laboratori in relazione alla provincia di appartenenza, la più bassa partecipazione attiva si è registrata nella provincia di Reggio Calabria dove solo l'11% dei laboratori aderenti alla rete di sorveglianza ha effettuato almeno una segnalazione di isolamento di *Salmonella* spp.

### **Caratteristiche della rete di sorveglianza**

Nel periodo compreso tra febbraio 2013 e marzo 2015 sono stati confermati 105 casi umani di infezione da *Salmonella* spp. nella Regione Calabria. Le informazioni necessarie per la caratterizzazione del pattern epidemiologico in relazione alle caratteristiche dei soggetti coinvolti e agli eventuali fattori di rischio maggiormente riportati, sono state raccolte attraverso l'intervista telefonica. Pertanto, un aspetto cruciale è quello relativo alla percentuale di inchieste epidemiologiche complete che, mediamente, durante il periodo di sorveglianza si è mantenuta inferiore, anche se di poco, rispetto allo standard di riferimento (>75%) con un valore pari al 69% al quale vanno aggiunte il 3,8% di inchieste eseguite in modo parziale attraverso i dati reperiti in cartella clinica di pazienti di cui non era disponibile alcun recapito. Tra i soggetti contattati, solo 5 non hanno acconsentito a rispondere al questionario telefonico in quanto soggetti extracomunitari che non comprendevano l'italiano. Dal confronto dei due anni di attività si rileva una riduzione, sebbene non statisticamente significativa, delle inchieste complete che sono state il 71,6% nel I anno e il 65,6% nel II anno ( $\chi^2=0,572$ ;  $p=0,751$ ). Tra i fattori che hanno determinato la possibilità di condurre l'intervista telefonica, sicuramente la completezza e la tempestività delle segnalazioni da parte dei laboratori periferici al centro di riferimento hanno avuto un ruolo di primo piano.

Per quel che riguarda le informazioni concernenti il paziente affetto da salmonellosi, il protocollo operativo inviato ai laboratori prevedeva che venissero riportate in una apposita scheda da allegare al campione biologico. L'intero periodo di sorveglianza è stato caratterizzato dall'elevata frequenza di casi di trasmissione incompleta dei dati anagrafici del paziente e solo circa i due terzi delle segnalazioni effettuate sono risultate complete. Non si riscontrano differenze significative nella completezza delle segnalazioni tra i due anni di attività del sistema di sorveglianza ( $\chi^2=0,003$ ;  $p=0,953$ ).

Relativamente alla tempestività della segnalazione, il protocollo operativo inviato ai laboratori periferici non riportava una finestra temporale entro la quale segnalare il caso al centro di riferimento, ma solo la necessità di effettuare la segnalazione in presenza di un isolamento. L'obiettivo era di ridurre il rischio di una mancata segnalazione nel caso in cui il referente del laboratorio periferico, per motivi diversi, non avesse effettuato la segnalazione entro i termini indicati dal protocollo. Nel definire l'indicatore e il relativo standard di

riferimento, abbiamo preso in considerazione sia il tempo medio di segnalazione da parte della maggioranza dei laboratori, che è stato di circa 48 ore, sia le tempistiche necessarie per completare l'inchiesta epidemiologica riducendo al minimo il rischio di "recall bias". Pertanto, la segnalazione è stata considerata tempestiva se effettuata dal laboratorio periferico entro 96 ore dall'isolamento di *Salmonella* spp. Durante il periodo di sorveglianza l'81% delle segnalazioni è stata valutata come "tempestiva" e, pertanto, inferiore rispetto allo standard del relativo indicatore. Nessuna significativa differenza è emersa dal confronto tra i due anni di attività del sistema di sorveglianza ( $\chi^2=0,0004$ ;  $p=0,984$ ).

## Raccolta dei ceppi di *Salmonella* spp. e analisi dei dati

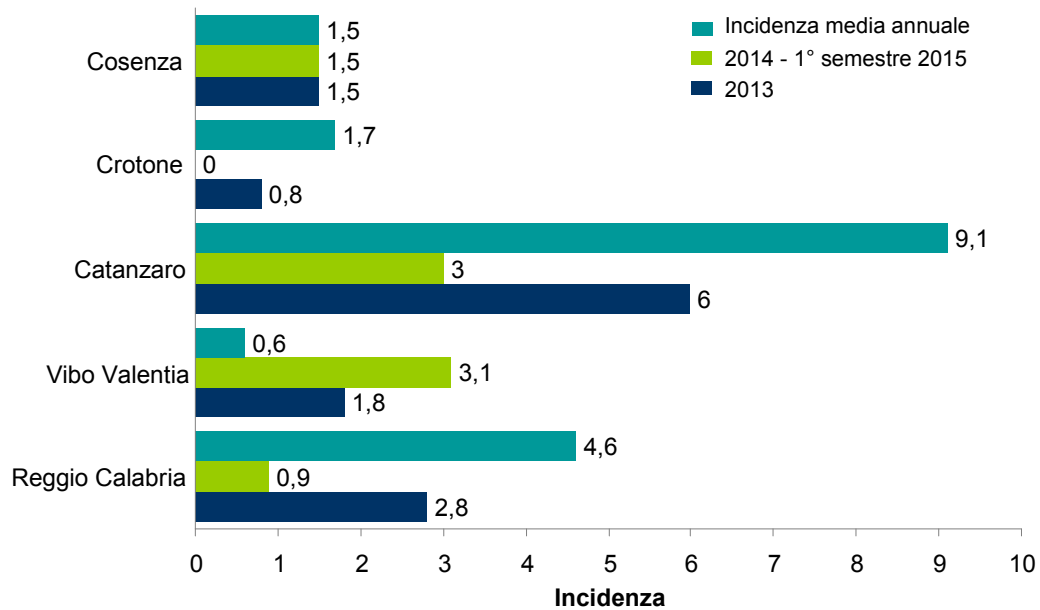
Dall'analisi dei tassi specifici per età emerge come la fascia maggiormente colpita sia quella pediatrica con un'incidenza annuale media di 28,4 casi/100.000 nei bambini tra 1 e 5 anni e di 27,4 casi/100.000 nei bambini al di sotto di un anno.

Al fine di consentire il confronto tra il dato rilevato in Calabria dal sistema di sorveglianza e il dato nazionale è stata eseguita una standardizzazione diretta dei tassi. Il valore di riferimento, con il quale confrontare il tasso di salmonellosi in Calabria, è stato determinato a partire dal tasso d'incidenza italiano pubblicato dalla *European Food Safety Authority* (EFSA). L'ultimo dato nazionale disponibile è quello pubblicato nel 2013 e relativo all'anno 2011, ed è pari a 5,5 casi/100.000/anno. Tuttavia, a partire dal 2004, le infezioni umane da *Salmonella* spp. sono state caratterizzate da un costante decremento, presumibilmente legato al successo delle strategie di controllo in atto nell'Unione Europea della *Salmonella* spp. nel pollame, e che è possibile quantificare in una riduzione media annua di 1,4 casi/100.000. Pertanto è parso opportuno ridurre il valore del 2011 individuando uno standard per il periodo di sorveglianza di 2,7 casi/100.000/anno. Considerando il dato medio annuale rilevato dal sistema di sorveglianza, il tasso grezzo d'incidenza in Calabria è risultato pari a 2,6 casi/100.000/anno, del tutto sovrapponibile il tasso standardizzato che è risultato pari a 2,7 casi/100.000/anno e quindi in linea rispetto allo standard di riferimento.

Il 57% dei casi ha interessato soggetti di sesso maschile. Per quel che riguarda il tasso d'incidenza è risultato per entrambi i sessi inferiore rispetto al dato nazionale, con un valore pari a 2,9/100.000/anno per i maschi (Italia: 4,6/100.000/anno) e di 2,1 per le donne (Italia: 4,1/100.000/anno). Occorre precisare che il dato nazionale è un valore medio dei casi rilevati in Italia tra il 1980 e il 2011 (4); è quindi probabile che un numero non indifferente di casi si sia verificato prima dell'attuazione delle strategie di controllo sul pollame.

Il numero maggiore di segnalazioni si è avuto nella provincia di Catanzaro con un tasso d'incidenza medio annuo di 6 casi/100.000, mentre Crotone con 0,8 casi/100.000/anno risulta essere la provincia con il minor numero di segnalazioni (Figura 12).

Dai dati emersi dalle interviste telefoniche la totalità dei pazienti ha presentato manifestazioni cliniche e i sintomi più frequenti sono stati: diarrea (100%), febbre (87,5%), cefalea e sangue nelle feci (50%). Tutti i pazienti si sono rivolti ad un medico: il 69% al Medico di Medicina Generale o Pediatra di Libera Scelta e il 28% al Pronto Soccorso. Il 78% dei pazienti ha eseguito antibiotico terapia con durata media di 9,1 giorni ( $\pm 3,9$ ). L'83% dei pazienti è stato ricoverato, la durata media del ricovero è stata di 5,9 giorni ( $\pm 3,4$ ). Confrontando i due anni di attività del sistema di sorveglianza non sono emerse significative differenze nella percentuale di ospedalizzazioni ( $\chi^2=0,0001$ ;  $p=0,994$ ). Durante tutto il periodo di sorveglianza, la percentuale di campioni provenienti da pazienti ospedalizzati sul numero totale di casi confermati inviati dai laboratori afferenti alla rete di sorveglianza, è stata sempre sostanzialmente maggiore rispetto allo standard del 45% evidenziando la difficoltà del sistema di sorveglianza di intercettare i casi meno gravi di infezione da *Salmonella* spp.



**Figura 12. Tassi grezzi d'incidenza per anno e per provincia di segnalazione**

A questo proposito è necessario sottolineare che nel calcolo dell'indicatore vengono prese in considerazione solo le segnalazioni complete, con esclusione dei casi confermati ma mancanti delle informazioni necessarie alla conduzione dell'inchiesta epidemiologica. È, pertanto, verosimile che vi sia una sovrastima dell'ospedalizzazione e che i casi di cui non abbiamo informazioni siano più probabilmente quelli non ospedalizzati.

Un risultato interessante emerso dall'intervista telefonica riguarda la presenza di sintomi tra i familiari dei soggetti risultati positivi alla ricerca per *Salmonella* spp. Nel 25% dei casi almeno un familiare ha manifestato sintomi simili a quelli del paziente. Nella maggior parte dei casi il Medico di medicina generale/Pediatra di libera scelta ha prescritto terapia antibiotica empirica e solo in 4 casi ha consigliato di effettuare un approfondimento diagnostico mirato alla ricerca di *Salmonella* spp., di questi uno è risultato positivo ed è stato incluso nel nostro sistema di sorveglianza. Relativamente alla valutazione dell'esposizione a possibili fattori di rischio, tutti i soggetti hanno riferito il consumo di più categorie di cibi considerati a rischio. Tra gli alimenti maggiormente consumati dai pazienti nelle 24-48 ore precedenti l'insorgenza dei sintomi sono stati: carni cotte, latte e latticini nel 90% dei casi, salumi nel 71% dei casi, uova cotte nel 65% dei casi. Con minore frequenza sono state consumate verdure cotte (38%) e crude (35%) e uova crude (20%). Il 7,8% degli intervistati ha riferito di utilizzare acqua non condottata. Il consumo dei pasti è avvenuto nella quasi totalità dei casi all'interno del proprio domicilio. Nessuno dei soggetti intervistati aveva effettuato viaggi in aree a rischio.

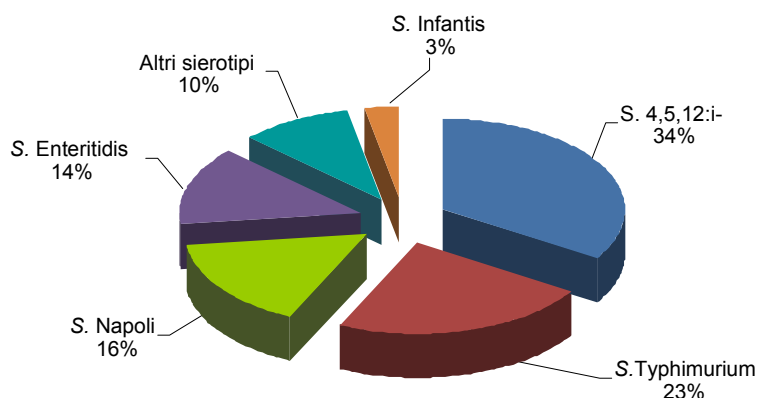
### **Caratterizzazione dei ceppi isolati**

Nel corso del periodo di sorveglianza sono stati isolati 105 ceppi di *Salmonella* spp. che sono stati sottoposti ad ulteriori analisi al fine di identificarne il sierotipo, il fagotipo, il profilo di resistenza agli antibiotici e su alcuni il profilo di elettroforesi in campo pulsato. I risultati relativi ai sierotipi di *Salmonella* isolati nell'uomo nel periodo 2013-2015 in Calabria sono riportati in Tabella 6 e confrontati con i dati del Sistema di Sorveglianza EnterNet.

**Tabella 6. Distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* isolati nell'uomo negli anni oggetto di studio in Calabria e confronto con i dati del Sistema di Sorveglianza EnterNet**

Sierotipo	2013		2014		2015
	Italia	Calabria	Italia	Calabria	Calabria
S. 4,5,12:i-	1979	18	1559	14	3
S. Typhimurium	931	10	586	11	2
S. Enteritidis	460	9	317	6	
S. Napoli	236	4	185	6	
S. Derby	147		114		1
S. Infantis	103	3	81		
S. Panama	84	1	30		1
S. Muenchen	83		38		
S. London	65	2	60		
S. Give	62		23		
S. Brandenburg	57		48		
S. Rissen	46		41	1	1
S. Thompson	43		17		
S. Goldcoast	34	1	47		
S. Agona	6	1	6		
S. Bredeney	23	1	17		
S. enterica salamae		1			
S. Messina	2	2			
S. Pomona	2	1	2		
S. Stanley	26	1	12		
S. Veneziana	10	1	8		
S. bongori					2
S. 4,5,12:-:-				1	
Altri sierotipi	606		422		
<b>Totale</b>	<b>5005</b>	<b>56</b>	<b>3613</b>	<b>39</b>	<b>10</b>

Come si può osservare i principali sierotipi identificati in Calabria sono stati *S. 4,5,12:i-*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Napoli* indipendentemente dall'anno e in analogia con quanto si osserva in Italia. Nello specifico *S. Typhimurium variante monofasica (S. 4,5,12:i-)* risulta il sierotipo più frequentemente responsabile di casi umani di salmonellosi (34%), seguito da *S. Typhimurium*: insieme questi due sierotipi rappresentano il 57% di tutti i ceppi isolati. Va segnalata, inoltre, l'elevata frequenza di ceppi di *S. Napoli* che, nel corso del periodo di sorveglianza, hanno rappresentato il 16% degli isolamenti (Figura 13).

**Figura 13. Sierotipi di *Salmonella* in Calabria nel periodo 2013-2015**



La distribuzione per fascia d'età dei casi di salmonellosi in Calabria è comparabile con quanto osservato in Italia, con il maggior numero di casi tra i soggetti di età 0-14 e  $\geq 65$  (Tabella 7).

**Tabella 7. Distribuzione dei ceppi di *Salmonella* per fascia d'età isolati nell'uomo negli anni oggetto di studio in Calabria e confronto con i dati del Sistema di Sorveglianza EnterNet**

Provenienza	0-14	15-24	25-64	$\geq 65$	NN	Totale
Italia	4728	333	1501	1789	621	8972
Calabria	79	1	7	13	5	105

Il fagotipo è stato effettuato solo su 16/35 ceppi di *S. 4,5,12:i-* e di questi 9 sono risultati essere fagotipo DT193, 1 DT7Var, 3 RDNC e 3 non tipizzabili. Per quanto riguarda *S. Typhimurium*, 1 è risultato essere fagotipo DT193, 2 DT195, 2 DT120, 2 DT39, 1 DT208, 1 RDNC e 2 non tipizzabili (Tabella 8).

**Tabella 8. Distribuzione dei fagotipi dei ceppi di *S. 4,5,12:i-* e *S. Typhimurium* isolati nell'uomo negli anni 2013-2015**

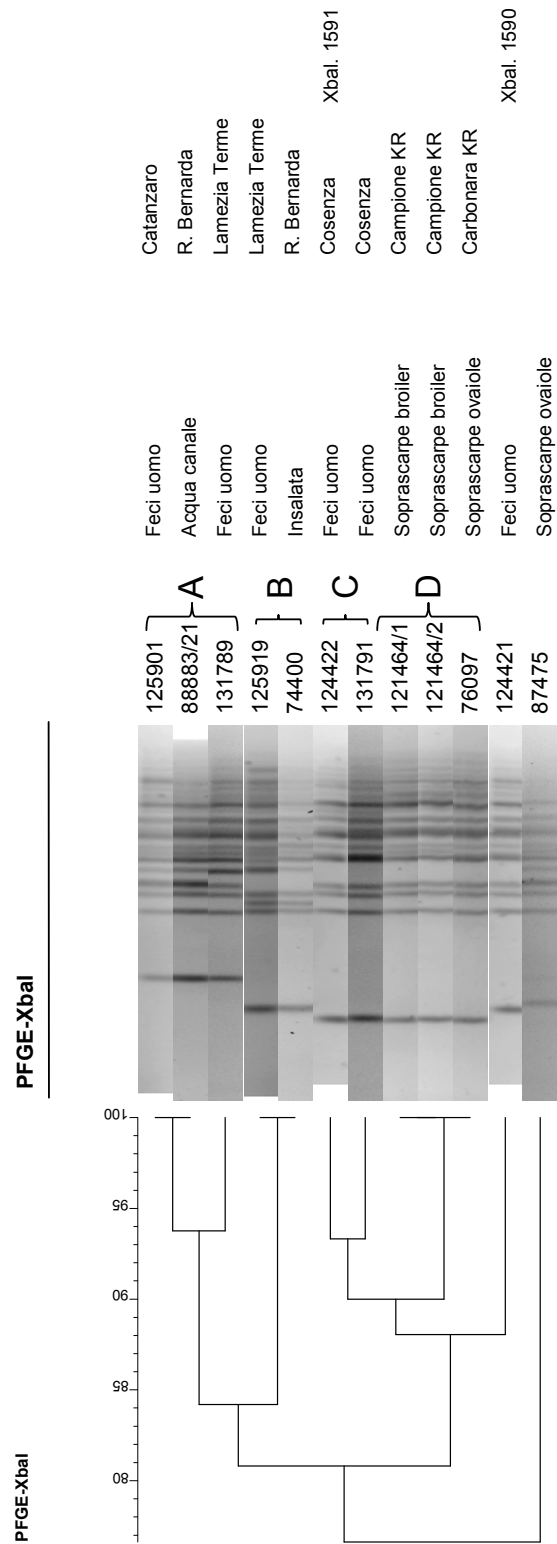
Sierotipo	193	195	120	39	208	7VAR	RDNC	NT	Non testato
<i>S. 4,5,12:i-</i>	9					1	3	3	19
<i>S. Typhimurium</i>	1	4	2	2	1		1	2	9

Su tutti gli isolati è stato effettuato il test per la determinazione del profilo di resistenza (Tabella 9) e su alcuni è stata anche applicata la metodica dell'elettroforesi in campo pulsato (Figura 14 e 15).

**Tabella 9. Distribuzione dei principali profili di resistenza dei ceppi di *Salmonella* isolati nell'uomo negli anni 2013-2015**

Sierotipo	Sensibile	ASSuT	ASSuT+altro	ACSSuT	ACSSuT+altro	Altri profili
<i>S. 4,5,12:i-</i>		15	6	2		12
<i>S. Typhimurium</i>	7	3	5		1	7
<i>S. Enteritidis</i>	7					8
<i>S. Napoli</i>	10					
<i>S. Agona</i>						1
<i>S. bongori</i>	2					
<i>S. Bredeney</i>						1
<i>S. Derby</i>						1
<i>S. Salamae</i>	1					
<i>S. Goldcoast</i>						1
<i>S. Infantis</i>	1					2
<i>S. London</i>						2
<i>S. Messina</i>	1					1
<i>S. Panama</i>	1					1
<i>S. Pomona</i>	1					
<i>S. Rissen</i>					2	
<i>S. 4,5,12:-:-</i>						1
<i>S. Stanley</i>	1					
<i>S. Veneziana</i>						1
<b>Totale</b>	<b>32</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>39</b>





Catanzaro  
R. Bernarda  
Lamezia Terme  
Lamezia Terme  
R. Bernarda  
Cosenza  
Cosenza  
Campione KR  
Campione KR  
Carbonara KR  
Xbal. 1591  
Xbal. 1590

Feci uomo  
Acqua canale  
Feci uomo  
Feci uomo  
Insalata  
Feci uomo  
Feci uomo  
Soprascarpe broiler  
Soprascarpe broiler  
Soprascarpe ovaiole  
Feci uomo  
Soprascarpe ovaiole

Figura 15. Dendrogramma e analisi dei cloni di *S. Napoli* isolati nell'uomo, negli animali, nei vegetali e in campioni di acque ambientali in Calabria negli anni 2013-2015

La determinazione dei profili di resistenza ha evidenziato una ampia variabilità anche se per quanto riguarda *S.* 4,5,12:i- il profilo maggiormente rappresentato è stato ASSuT da solo o con l'aggiunta di altre resistenze in accordo a quelli identificati in tutta Italia. La *S.* Napoli anche in questo caso in accordo ai dati italiani è risultata essere sensibile a tutto il panel di antibiotici saggiato.

I profili di elettroforesi in campo pulsato per *S.* Typhimurium e *S.* 4,[5],12,:i- (vedi Figura 14) e *S.* Napoli (vedi Figura 15) ottenuti durante l'intero periodo di studio sono stati confrontati al fine di identificare la presenza di eventuali cloni circolanti. Gli isolati umani di *S.* Napoli sono stati inoltre confrontati con i ceppi di *S.* Napoli isolati da altre origini (specie aviarie, vegetali e acque ambientali).

Come si può osservare dalla Figura 14 sono stati evidenziati negli isolati umani di *S.* Typhimurium e *S.* variante monofasica 8 cloni principali (A, B, C, D, E, F, G, H) con un grado di similitudine superiore al 95%. Il clone A è formato da quattro ceppi di *S.* variante monofasica, il clone B da due ceppi di *S.* variante monofasica, il clone C da quattro ceppi di *S.* variante monofasica, il clone D da quattro ceppi di *S.* variante monofasica, il clone E da tre ceppi di *S.* variante monofasica, il clone F da quattro ceppi di *S.* variante monofasica, il clone G da un ceppo di *S.* Typhimurium e un ceppo di *S.* variante monofasica e il clone H da tre ceppi di *S.* Typhimurium.

Come si può osservare dalla Figura 15 (ceppi di *S.* Napoli) risultano uguali tra di loro con una percentuale di omologia del 100%:

- i due ceppi isolati dagli animali (121464/1, 121464/2) e il ceppo 76097 (clone D);
- il ceppo umano 125919 con il ceppo vegetale 74400 (clone B).

Gli altri due cloni hanno una % di omologia inferiore:

- i ceppi umani 125901 e 131789 con il ceppo isolato dal campione di acqua 88883/21 (clone A);
- il ceppo umano 124422 e il ceppo isolato da broiler 131791 (clone C).

È importante evidenziare che il ceppo isolato dal campione vegetale proviene dalla stessa azienda da cui è stato isolato il ceppo dal campione di acqua utilizzata per irrigare.

## ATTIVITÀ SVOLTA IN CAMPANIA

### Studio su animali, vegetali e ambiente

#### Definizione delle aree di studio

La prima fase del progetto ha previsto l'individuazione delle aree di studio che in questo caso è stata la Piana del Sele, una pianura di circa 500 km<sup>2</sup> che si estende lungo il percorso del fiume Sele nella provincia di Salerno, delimitata a Nord dalle propaggini meridionali dei monti Picentini, ad Est dalla valle del Sele, a Sud dai rilievi del Sub-appennino lucano e a Ovest dal golfo di Salerno. L'area è il principale centro di produzione europeo di insalate da taglio per preparazioni pronte al consumo (IV gamma), attività che impegna circa 4000 ettari di superficie a tunnel-serra fredda e diversi stabilimenti di trasformazione, con un peso economico considerevole per la provincia. In questa area sono presenti anche numerosi allevamenti, con una densità però molto inferiore a quella della contigua area a sud del fiume Sele, interessata da una consistente presenza dell'allevamento bufalino e della connessa industria casearia. Per le produzioni orticole, il sistema di irrigazione prevalente è l'aspersione a bassa pressione, che comporta la bagnatura delle colture e, quindi, può portare a contaminazioni se vengono impiegate acque inquinate. Tuttavia, la maggior parte delle aziende agricole impegnate in queste produzioni irriga le colture con acque di falda emunte da pozzi aziendali. Negli ultimi anni, un considerevole numero di tossinfezioni da *Salmonella* verificatesi in Europa sono state associate al consumo di prodotti vegetali (soprattutto rucola) provenienti dalla Piana del Sele. Per valutare la contaminazione microbica, nello specifico da *Salmonella*, nei prodotti orticoli coltivati nella Piana del Sele e individuare le possibili fonti di contaminazione microbica dell'area, il Ministero della Salute ha in precedenza stimolato e finanziato attività di studio che hanno visto coinvolti l'ISS, l'IZSM e il CRA-ORT. È stata messa così in luce la considerevole contaminazione da *Salmonella* spp. delle acque superficiali dell'area. Numerosi sono stati i sierotipi identificati, tra i quali prevaleva *S. Napoli* (26%), sierotipo frequentemente associato agli *outbreak* legati al consumo di insalate verificatesi in Europa seguita da *S. Typhimurium* (16%), *S. Derby* (7%) e altro.

Nella fase conclusiva della ricerca l'indagine, limitatamente alla ricerca di *Salmonella* nei vegetali, ha riguardato anche altre aree ad elevata vocazione agricola della regione. In particolare sono state sottoposte ad analisi prodotti agricoli provenienti dalle province di Caserta e Benevento.

L'ipotesi dell'acqua come veicolo di contaminazione in occasione di piogge intense, per intasamento della rete idrica di bonifica in un ambiente disordinatamente urbanizzato (considerando anche la superficie a serre-tunnel, sottratta al normale assorbimento del suolo) e con presenza di allevamenti nelle zone collinari, sembra compatibile con i dati fino ad ora raccolti, ma va verificata con ulteriori osservazioni. Nello stesso studio, indagini su rucola di 24 aziende (138 campioni analizzati) condotte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, non hanno portato all'isolamento di batteri patogeni, ma solo di coli fecali, benché su due campioni le analisi molecolari abbiano messo in evidenza la presenza di target riferibili a *Salmonella* spp. Si evince, quindi, che il riscontro di *Salmonella* sui prodotti vegetali preparati pronti per il consumo è rara, ma nondimeno costituisce un pericolo sanitario che mette a rischio la salute dei consumatori e pregiudica lo sviluppo di un importante settore economico. Le indagini precedentemente condotte, e sopra succintamente riassunte, ci hanno permesso di

focalizzare la nostra attenzione per l'espletamento delle attività previste per questo progetto, in un'area ben circoscritta del territorio regionale, la Piana del Sele appunto, della quale molti aspetti sulla contaminazione microbica ambientale erano stati messi in luce. Inoltre, all'interno della Piana del Sele abbiamo individuato diverse aree (Figura 16) che si differenziano sostanzialmente per l'impatto zootecnico. Nell'ambito del presente progetto, grazie all'esperienza precedentemente maturata, è stata focalizzata l'attenzione prevalentemente sulla contaminazione da *Salmonella*. A favore di questa decisione hanno anche giocato l'importanza di questo microrganismo quale causa di malattie trasmissibili con gli alimenti e la consapevolezza dell'importanza del serbatoio animale quale *reservoir* di questi patogeni.

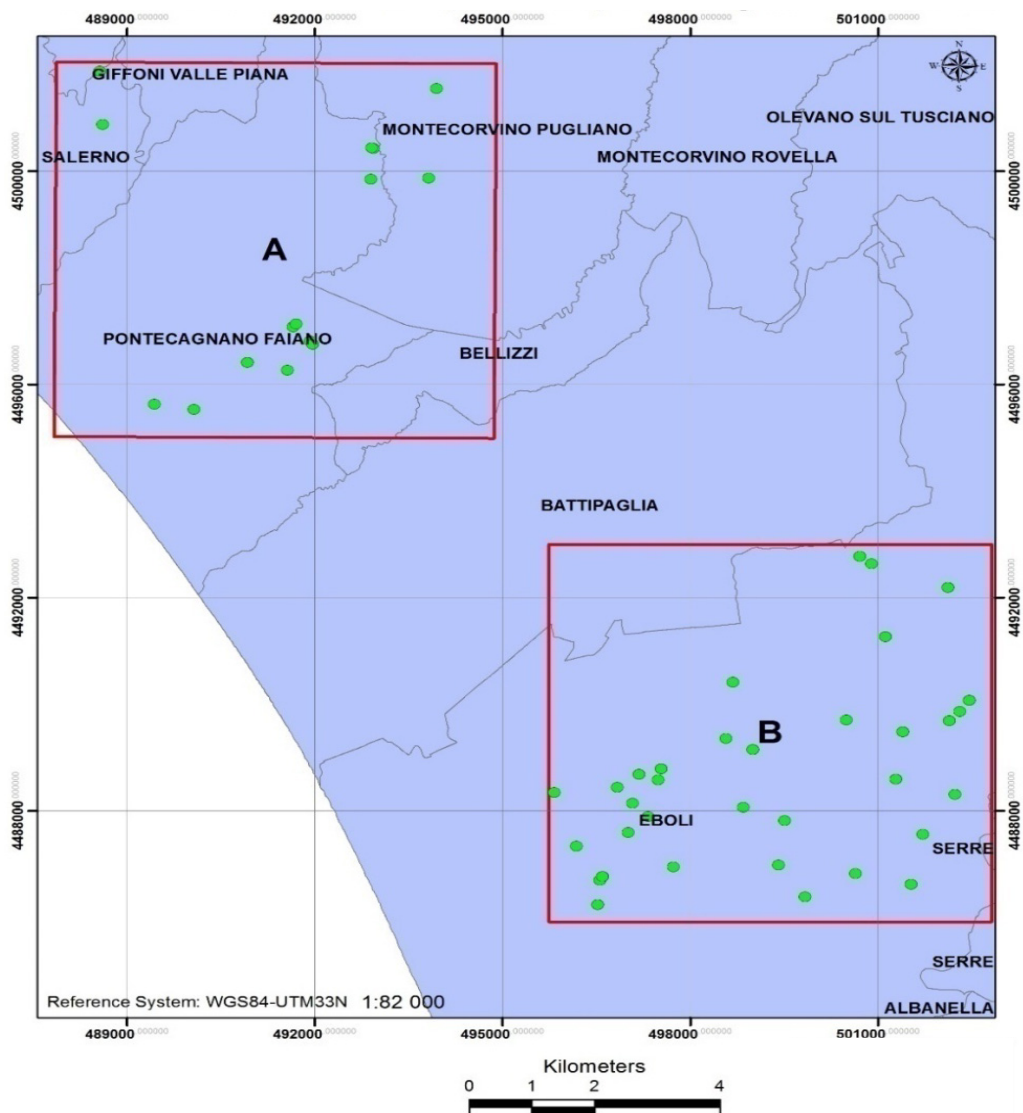
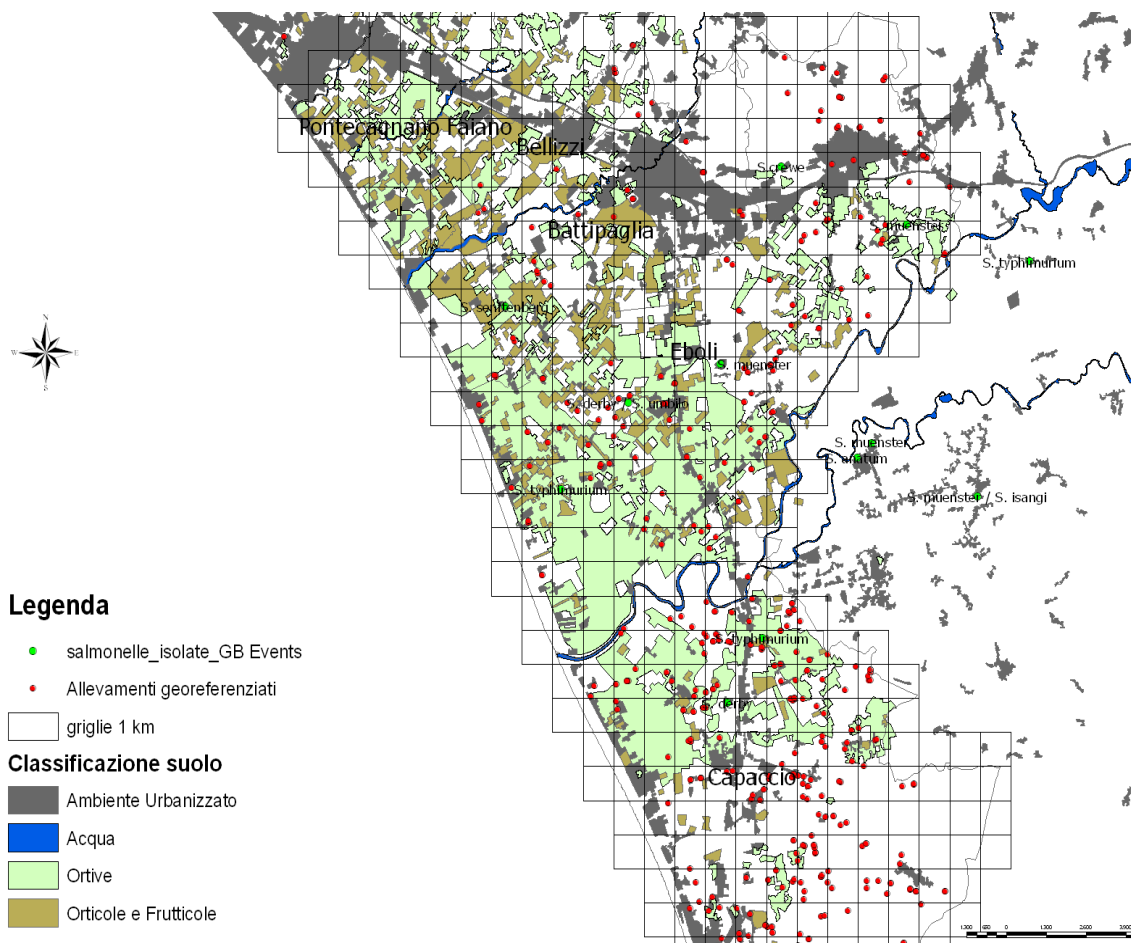


Figura 16. Allevamenti testati nella Piana del Sele: area a bassa densità zootecnica (A) e ad elevata densità zootecnica (B)

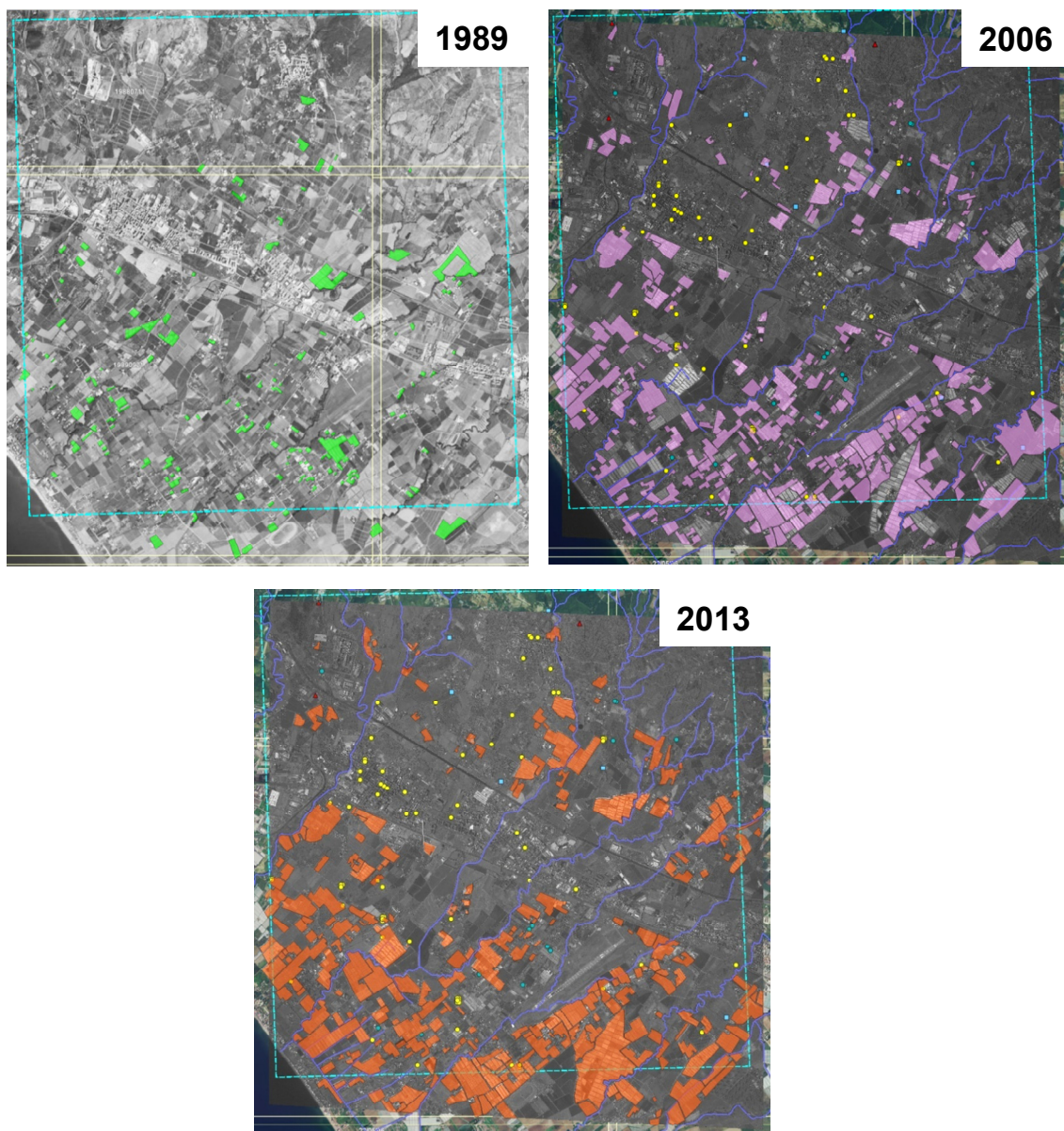
Si è provveduto a referenziare tutti gli allevamenti registrati presenti nella Piana del Sele in relazione anche all'uso agricolo del suolo (Figura 17).



**Figura 17. Piana del Sele, classificazione del suolo e collocazione aziende zootecniche**

La contiguità tra le aree agricole e allevamenti/periferie urbane, ha fatto emergere il dubbio che un “disordine” idrogeologico generalizzato dell’area, possa favorire la possibilità che le coltivazioni, anche quelle sotto serra, possano venire contaminate da acque non idonee all’utilizzo irriguo. Tale ipotesi è confortata dalla constatazione che le segnalazioni di allerta sanitaria che coinvolgono le produzioni orticole della Piana del Sele sono state più numerose nel periodo autunnale, e ciò potrebbe indicare una relazione con condizioni di disordine idrologico causate da eventi piovosi intensi possibili in tale periodo.

Il disordine idrologico può essere intensificato dall’urbanizzazione diffusa e dalla vasta superficie coperta con tunnel-serre dedicata alla produzione di ortaggi. È stata verificata, limitatamente alle due aree campione sopra individuate, quale sia stato negli anni l’incremento delle zone destinate alla coltivazione sotto serra utilizzando immagini satellitari (MARSEC; Benevento 2013) e aerofotografie dell’area (1989-2003) (Figura 18).



**Figura 18. Area Nord Piana del Sele: incremento delle coltivazioni sotto serra (1989-2013)**

L'indagine ha evidenziato che dal 1989 al 2013 si è registrato nelle zone controllate, un incremento delle aree destinate alla coltivazione sotto serra del 942%. Un incremento tanto significativo del suolo non esposto (terreno non disponibile per il naturale assorbimento dell'acqua piovana), può sicuramente favorire il verificarsi di fenomeni di esondazione dei canali di drenaggio e scolo che possono contaminare le condotte irrigue o i pozzi e, inoltre, possono essere causa diretta di contaminazione delle coltivazioni allagate.



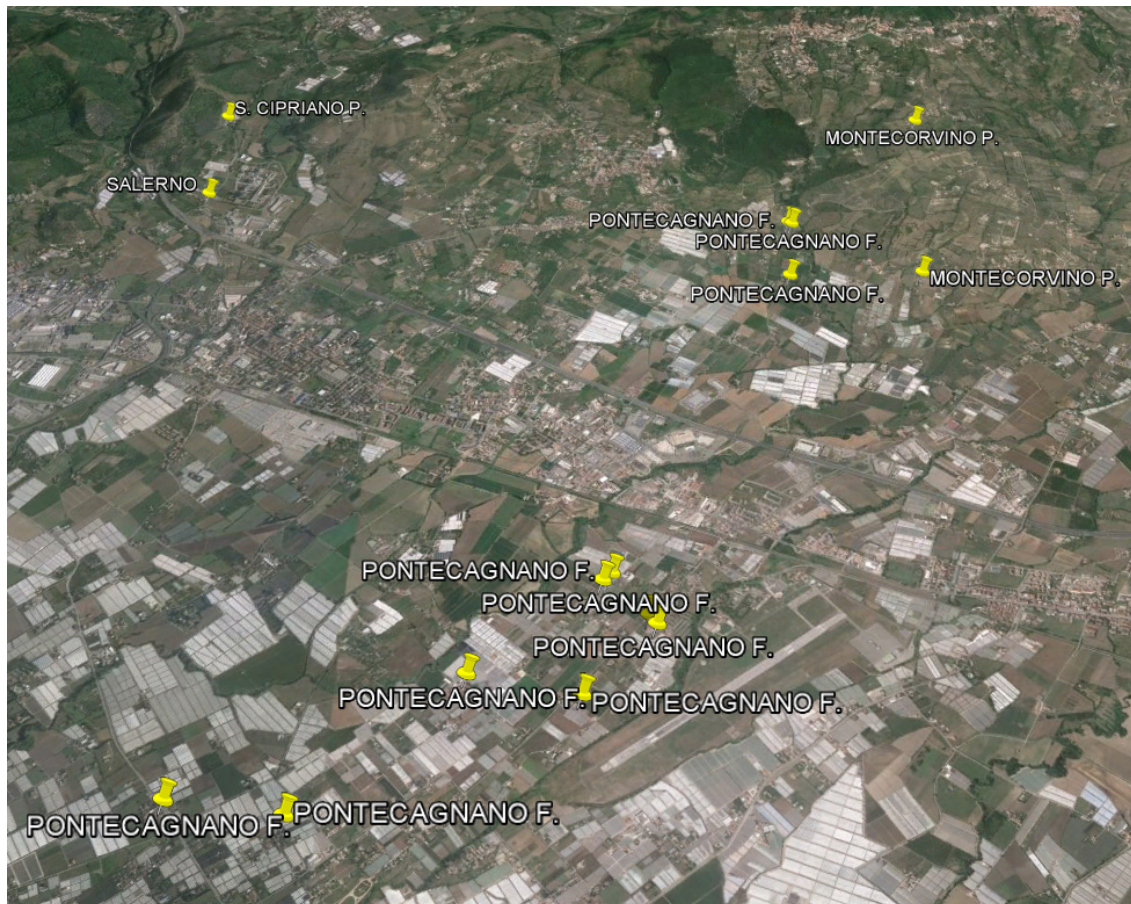
## Campionamenti

Nella prima fase della ricerca è stata valutata la contaminazione delle acque d'irrigazione della Piana del Sele e verificato l'eventuale presenza di patogeni su insalate coltivate nelle zone contraddistinte dalla maggiore prevalenza di *Salmonella* nelle acque superficiali.

Inoltre, è stato recuperato l'elenco delle aziende zootecniche della Piana del Sele nelle quali sono state effettuati i monitoraggi microbiologici. Nello specifico sono state considerate 15 aziende nella zona a bassa densità zootecnica (Area A) (Figura 19) e 48 nella zona ad alta densità zootecnica (Area B) (Figura 20).

Per quanto riguarda gli allevamenti presenti in Area A e Area B sono stati eseguiti 28 campioni utilizzando il metodo delle sovrascarpe e 11 tamponi ambientali.

Sono state prese in considerazione anche altre aziende della Piana del Sele non appartenenti alle Aree A e B (19 Aziende) o delle aree collinari che la delimitano a nord-est (Tabella 10).



**Figura 19. Piana del Sele: localizzazione delle aziende zootecniche registrate (area a bassa densità zootecnica) (comuni di Pontecagnano-Faiano, Montecorvino Pugliano, San Cipriano e Salerno)**



**Figura 20. Piana del Sele: localizzazione delle Aziende zootecniche registrate (area ad elevata densità zootecnica) (comune di Eboli)**

**Tabella 10. Aziende della Piana del Sele non incluse nelle Aree A e B**

<b>Comune</b>	<b>N. aziende</b>
Albanella	3
Altavilla S.	3
Baronissi	2
Giffoni Valle Piani	2
Giffoni Sei Casali	2
Pontecagnano-Faiano	2
Eboli	1
Montecorvino Rovella	1
Olevano sul Tusciano	1
Serre	1
Montecorvino Pugliano	1
<b>Totale</b>	<b>19</b>

Nelle aziende sopra indicate sono stati effettuati in totale 11 campioni utilizzando il metodo delle sovrascarpe e 4 campioni fecali. Inoltre sempre dalle stesse aziende sono stati analizzati 10 ceppi batterici provenienti da precedenti campionamenti. I campionamenti delle acque e dei vegetali prodotti dalle aziende utilizzatrici dei pozzi esaminati sono stati eseguiti con periodicità mensile. Complessivamente sono stati esaminati 311 campioni di acque superficiali (Tabella 11).

**Tabella 11. Campioni di acque superficiali prelevati nella Piana del Sele zone A e B**

Bacino idrico	N. campioni
Destra Sele	154
Pontecagnano-Faiano	63
Montecorvino	22
Fiume Picentino	50
Canali di bonifica	22
<b>Totale</b>	<b>311</b>

Sono stati inoltre esaminati 51 campioni di acque superficiali prelevati in canali di drenaggio delle acque della destra Sele utilizzati anche per l'irrigazione a pioggia delle colture e non sottoposti a precedenti controlli microbiologici. I punti di campionamento sono stati complessivamente 15. Durante il prelievo dei campioni si è reso possibile catturare in 3 punti di prelievo 6 esemplari di rana tutti identificati come rana comune (*Pelophylax esculentus*) che sono stati stabulati singolarmente per 14 giorni. Dalle acque di stabulazione si è proceduto con cadenza settimanale alla ricerca di *Salmonella*.

I campioni vegetali prelevati nella Piana del Sele (Area A e B) derivano da 5 diversi comuni (Battipaglia, Bellizzi, Eboli, Montecorvino Rovella e Pontecagnano-Faiano) e sono stati 266 (rucola, lattuga, spinacio ed erbette) (Tabella 12).

**Tabella 12. Campioni vegetali prelevati nella Piana del Sele (zona A e B) per specie e comune di campionamento**

Area/Comune di campionamento	Specie	N. campioni
Battipaglia	Basilico GENA	5
Eboli	Basilico	9
Pontecagnano-Faiano	Basilico	3
Battipaglia		19
Bellizzi	Lattuga	12
Eboli		14
Eboli	Fragole	15
Pontecagnano-Faiano		15
Eboli	Finocchi	8
Battipaglia		16
Bellizzi	Insalate	9
Montecorvino Rovella		11
Battipaglia	Mix	8
Battipaglia		19
Eboli	Pomodori	11
Bellizzi		18
Bellizzi	Prezzemolo	4
Battipaglia		12
Eboli		5
Montecorvino Rovella	Rucola	9
Pontecagnano-Faiano		
Pontecagnano-Faiano	Scarole ricce	11
Montecorvino Rovella	Sedano	6
Eboli	Valeriana	11
Eboli	Spinaci	17
Bellizzi	Zucchine	11

Ad integrazione dei campioni vegetali prelevati nella zona A e B sono stati presi in considerazione anche campioni vegetali provenienti da altre province per un totale di 86 di varia tipologie. Nello specifico 67 campioni sono stati prelevati in campo e 19 campioni acquistati in mercati comunali o direttamente dai produttori (Tabella 13).

**Tabella 13. Campioni vegetali prelevati in comuni della Piana del Sele non inclusi nelle Aree A e B per specie e comune di campionamento**

Provincia e comune di campionamento	Specie	N. campioni
<b>Salerno</b>		
Vallo delle Lucania*	Bietole	2
Altavilla S.*	Cetrioli	1
S. Cipriano P.*	Cipolle	1
S. Cipriano P.*	Fagiolini	1
Agropoli*	Melanzane	3
Castel S. Lorenzo	Peperoni	4
Angri	Pomodori	8
Castel S. Lorenzo	Zucchine	2
<b>Caserta</b>		
Maddaloni*	Broccolo	4
Maddaloni*	Cavoli	2
Maddaloni	Pomodori	5
Maddaloni	Melanzane	3
Marcianise	Rucola	2
Marcianise	Broccolo	1
Pietramelara	Cavolo	2
Caiazzo	Fragole	1
Caiazzo*	Insalata	3
Casagiove	Zucchine	2
Cellole	Insalata	2
Cellole	Basilico	2
Vitulazio*	Cipolle	1
Pastorano	Pomodori	4
Grazzanise	Pomodori	4
Frignano*	Cavolo	1
Roccamonfina	Asparago	2
<b>Avellino</b>		
Lauro	Pomodoro	3
Montoro	Carciofi	2
<b>Benevento</b>		
Montesarchio	Spinaci	3
Montesarchio*	Lattuga	1
Morccone*	Spinaci	1
Morccone	Broccolo	2
Pietraraja	Melanzane	3
Pietrelcina	Pomodori	4
S. M. Sannita	Broccolo	4

\* Merce acquistata in mercati comunali direttamente dal produttore

Al fine di avere una panoramica più completa degli isolati di *Salmonella* in Campania si è deciso di analizzare anche ceppi batterici provenienti dall'attività diagnostica di routine svolta su campioni di origine animale da altre sezioni dell'IZS della Campania. Hanno collaborato in particolare le sezioni di Salerno e di Avellino dell'IZSM (Tabelle 14-15).

**Tabella 14. Isolati d'origine animale della Provincia di Salerno**

Comune	N. isolati	Area
Altavilla Salentina	2	Piana del Sele
Postiglione	1	extra Piana del Sele
Salerno	1	extra Piana del Sele
Giovi	1	extra Piana del Sele
Capaccio	1	Piana del Sele
Paestum	1	Piana del Sele
Serre	2	extra Piana del Sele
Vallo della Lucania	1	extra Piana del Sele
Nocera Inferiore	1	extra Piana del Sele
Padula	2	extra Piana del Sele
Teggiano	2	extra Piana del Sele
San Mango Piemonte	1	extra Piana del Sele
Eboli	2	Piana del Sele
Baronissi	1	extra Piana del Sele
Pagani	1	extra Piana del Sele
Oliveto Citra	1	extra Piana del Sele
Olevano sul Tusciano	2	Piana del Sele
Angri	2	extra Piana del Sele
Rocccaspide	1	extra Piana del Sele
Felitto	1	extra Piana del Sele
Fisciano	1	extra Piana del Sele
Sassano	1	extra Piana del Sele
Sala Consilina	1	extra Piana del Sele

**Tabella 15. Isolati d'origine animale da altre province della Campania**

Provincia	Comune	N. isolati
Napoli	Castel Volturno	2
Napoli	Bacoli	1
Napoli	Nola	1
Caserta	Mondragone	1
Avellino	Apice	1
Avellino	Venticano	1
Benevento	S. S. Telesino	2
Napoli	Bacoli	1

## Risultati

Su tutti i campioni di acqua e vegetali la ricerca di *Salmonella* è stata effettuata mediante screening in Real Time PCR (iQ-Check *Salmonella* II Kit -BioRad). I campioni positivi sono stati testati successivamente con metodiche microbiologiche accreditate (ISO 6579). I ceppi di *Salmonella* identificati sono stati testati per l'identificazione del sierotipo, del profilo di resistenza e del profilo di virulenza. Gli antibiotici sono descritti in Tabella 16. Dai 362 campioni totali di acqua sono stati isolati 129 ceppi di *Salmonella* (35,6%) appartenenti a diversi sierotipi (Tabella 17). I principali sierotipi identificati sono stati *S. Napoli* (23,3%), *S. Typhimurium* (11,6%), *S. Fisherhuet* (10,9%) e *S. enterica* Diarizonae (6,2%). È interessante evidenziare che la *S. Typhimurium* variante monofasica si trova al sesto posto (3,9%). La *S. Napoli* è stata riscontrata in tutti i sistemi idrici superficiali controllati mentre *S. Typhimurium* in tutte le acque irrigue e di bonifica ma non nella zona del fiume Picentino. I sierotipi Manhattan (6,2%) e Reading (1,6%) sono stati trovati solo nelle acque del canale irriguo Destra Sele. La presenza di diversi tipi di *S. enterica* nella stessa area di campionamento è indice di una considerevole contaminazione.

**Tabella 16. Descrizione degli antibiotici utilizzati per i saggi di suscettibilità degli isolati di *Salmonella***

Antibiotico	Concentrazione ( $\mu\text{g}$ )
Trimethopim + Sulfametoxazolo (SXT)	25
Sulfonamide (Su)	300
Acido Nalidixico (Na)	30
Enrofloxacin (ENR)	10
Ciprofloxacina (CIP)	5
Colistina solfato (Col)	10
Ampicillina (A)	10
Cefalotina (CF)	30
Cefotaxime (CTX)	30
Tetraciclina (T)	30
Gentamicina (GM)	10
Kanamicina (K)	30
Ceftazidime (CAZ)	30
Streptomicina (S)	10
Cloramfenicolo	30
Amoxicillina + Acido clavulanico (AMC)	30
Cefoxitin (FOX)	30

**Tabella 17. Distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* isolati dai campioni di acqua esaminati**

Sierotipo	N. ceppi isolati
S. Napoli	30
S. Typhimurium	15
S. Fisherhuetten	14
S. Enterica Diarizonae	8
S. Manhattan	8
S. Thompson	7
S. Derby	5
S. Hadar	5
S. Typhimurium var. monofasica	5
S. Houtenae	3
S. Salamae	3
S. Szentes	3
S. Blockley	2
S. Reading	2
S. Rissen	2
S. Umbilo	2
S. Veneziana	2
S. Worthington	2
S. Agona	1
S. Bongori	1
S. Brazil	1
S. Eastbourne	1
S. Enteritidis	1
S. Eppendorf	1
S. Kapemba	1
S. Kasenyi	1
S. Kottbus	1
S. Messina	1
S. Senftenberg	1

La determinazione del profilo di resistenza ha evidenziato che il 62% (80/129) dei ceppi sono sensibili a tutto il panel di antibiotici mentre 48 ceppi hanno presentato un profilo di resistenza o multi resistenza (Tabella 18).

Tabella 18. Profili di resistenza dei ceppi di *Salmonella* isolati dai campioni di acqua

Sierotipo (n. di ceppi)	Profilo di resistenza
S. Typhimurium var. Monofasica	ASCef
S. Typhimurium var. Monofasica	A
S. Typhimurium var. Monofasica	ACef
S. Napoli	A
S. Napoli	Cef
S. Napoli	Cf
S. Napoli	C
S. Napoli (4)	S
S. Reading (2)	S
S. Rissen (2)	S
S. Salamae (3)	S
S. Senftenberg	S
S. Szentes	SGm
S. Szentes	SGmK
S. Szentes	SK
S. Thompson	SSuT
S. Thompson	SSuTNaK
S. Thompson (5)	SSu
S. Typhimurium	STNa
S. Typhimurium	ASTTNaK
S. Typhimurium	ASu
S. Typhimurium	SSu
S. Typhimurium	SuK
S. Typhimurium	SuNaCipCfCaz
S. Typhimurium (3)	ST
S. Typhimurium (5)	Su
S. Umbilo	SuT
S. Umbilo	T
S. Veneziana	T
S. Veneziana	TEnr
S. Worthington	TNa
S. Wortington	Sensibile
S. Agona	Sensibile
S. Blockley (2)	Sensibile
S. Bongori	Sensibile
S. Derby (5)	Sensibile
S. Diarizonae (8)	Sensibile
S. East Bourne	Sensibile
S. Enteritidis	Sensibile
S. Eppendorf	Sensibile
S. Fischerhuetten (14)	Sensibile
S. Hadar (5)	Sensibile
S. Hautanae (3)	Sensibile
S. Kapemba (1)	Sensibile
S. Kasenyi	Sensibile
S. Kottbus	Sensibile
S. Manhattan (8)	Sensibile
S. Messina	Sensibile
S. Typhimurium var. Monofasica (2)	Sensibile
S. Napoli (22)	Sensibile

Per quanto riguarda le aziende zootecniche sono stati isolati dagli animali 67 *Salmonella* i cui sierotipi sono descritti in Tabella 19.

**Tabella 19. Distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* isolati dai campioni animali**

Sierotipo	N. ceppi isolati
S. Typhimurium	13
S. Diarizonae	10
S. Rissen	6
S. Kentucky	4
S. Coeln	3
S. Enteritidis	3
S. Infantis	3
S. London	3
S. Derby	2
S. Napoli	2
S. Virchow	2
S. Agona	1
S. Bardo	1
S. Blockley	1
S. Bovismorbificans	1
S. Brandenburg	1
S. Bredeney	1
S. Goldcoast	1
S. Kasenyi	1
S. Livingstone	1
S. Manhattan	1
S. Mbandaka	1
S. Ohio	1
S. Reading	1
S. Thompson	1
S. Toulon	1
S. Y:1.8:Z10:1.5 nuovo sierotipo	1

In merito alla resistenza degli isolati da animali 25 ceppi sono risultati multiresistenti cioè resistenza ad almeno 4 delle molecole saggiate, mentre gli altri ceppi hanno presentato completa suscettibilità agli antibiotici testati (Tabella 20). Dai campioni di origine vegetale sono state isolate solo 2 *Salmonella* e entrambe sierotipo Napoli (1 insalata, 1 erba medica).

**Tabella 20. Profili di resistenza dei ceppi di *Salmonella* isolati dai campioni animali**

Sierotipo (n. ceppi)	Profilo di resistenza
S. Diarizonae (2)	ACSSuTCef
S. Diarizonae (2)	ACSKTmp
S. Enteritidis	ACSSuTNa
S. Enteritidis	ACSSuTCaz
S. Enteritidis	ASSuTCef
S. Goldcoast	ASSuTCef
S. Infantis (3)	ASSuTCef
S. Kasenyi	ASSuTCefCipGmAmcCfCaz
S. Kentucky (2)	ASSuTNaCef
S. Kentucky	ASSuTNaCefTmp
S. Kentucky	AASTCef
S. Livingstone	ASTCef
S. London	CCAZ
S. London	ASTNaCefKEnrCf

segue



continua

Sierotipo (n. ceppi)	Profilo di resistenza
S. London	ASuTCef
S. Manhattan	CSSuTCipGmKCIAMcCfCaz
S. Mbandaka	CT
S. Napoli	SuT
S. Napoli	Na
S. Ohio	Na
S. Reading	NaCipCf
S. Rissen	SCf
S. Rissen	SSu
S. Rissen	SSuNa
S. Rissen (3)	S
S. Thompson	SSuT
S. Toulon	SSuTK
S. Typhimurium	ST
S. Typhimurium	ASuT
S. Typhimurium	TCip
S. Typhimurium	SSuTNaK
S. Typhimurium	SuTNaKTmp
S. Typhimurium	SuTNaKTmpCf
S. Typhimurium (2)	SuNa
S. Typhimurium (2)	SuT
S. Typhimurium (3)	T
S. Virchow (2)	TNa
S. Y:1,8:Z10:1,5	Sensibile
S. Agona	Sensibile
S. Bardo	Sensibile
S. Bovis Morbificans	Sensibile
S. Brandenburg	Sensibile
S. Bredeney	Sensibile
S. Coeln (3)	Sensibile
S. Derby (2)	Sensibile
S. Diarizonae (6)	Sensibile

Nella Tabella 21 sono riportati i principali profili di virulenza suddivisi per sierotipo ottenuti dall'analisi di tutti i 129 ceppi isolati dai campioni di acqua. I due isolati di *S. Napoli* dagli alimenti (1 insalata; 1 erba medica) provenivano entrambi da campioni prelevati in provincia di Caserta. Essi evidenziavano sensibilità agli antibiotici e i seguenti profili di virulenza: insalata (gipA; sopE; sspH1; sspH2); erba medica (gtgB; sspH2).

Nella Tabella 22 sono riportati i principali profili di virulenza suddivisi per sierotipo ottenuti dall'analisi di tutti i 67 ceppi isolati dai campioni animali. Lo studio dei fattori di virulenza evidenzia una grande variabilità ad eccezione della *S. Coeln*, *S. Diarizonae*, *S. Rissen* e *S. Typhimurium* in cui i profili di virulenza sembrano essere maggiormente omogenei.

Si può riassumere che in Campania *S. Napoli* dimostra di essere un sierotipo di considerevole impatto per la salute pubblica. Essa non è stata mai isolata da alimenti di origine animale e solo eccezionalmente si riscontra in animali domestici. *S. Napoli* costituisce il principale sierotipo riscontrato nelle acque superficiali e si isola frequentemente negli animali selvatici. Il sierotipo Napoli è l'unico evidenziato nei vegetali (solo 2 isolamenti). Probabilmente la contaminazione deriva dall'utilizzo di acque contaminate a scopo irriguo. Il sierotipo non sembra essere in grado di caratterizzare gli isolati in funzione della effettiva patogenicità. La caratterizzazione molecolare può, invece, essere d'ausilio nel monitoraggio a fini epidemiologici degli isolati.

Tabella 21. Profilo di virulenza dei ceppi di *Salmonella* isolati dalle acque

Sierotipo (n. ceppi)	Profilo di virulenza
S. Agona	g8;gipA;gtgB;sopE;sspH2;sodC1
S. Blockley	g13;gtgB;sspH1;sodC1
S. Blockley	g13;sspH1;sspH2;sodC1
S. Bongori	gipA
S. Brazil	g13;g8;gipA;sspH1
S. Derby	g8;sspH2
S. Derby	g8;gipA;sspH1;sspH2
S. Derby	g13;gipA;gtgB;sspH1
S. Derby	sopE;sspH1;sspH2
S. Derby	sieB;g8;sspH1;sspH2;sodC1
S. Diarizonae	gipA;sspH1;sspH2;srgA
S. Diarizonae	gipA;nanH;sspH1;srgA
S. Diarizonae	gipA;nanH;sspH2;sodC1
S. Diarizonae (5)	g13;g8;gipA;nanH;sspH1;sspH2
S. EastBourne	g13;g8
S. Enteritidis	gtgB;sopE;sspH2;sodC1;mig5;srgA
S. Eppendorf	gipA;sspH1;sspH2;mig5;srgA
S. Fischerhuetten	sspH2
S. Fischerhuetten	g13;sopE;sspH1;sspH2
S. Fischerhuetten	g8;sspH1
S. Fischerhuetten (11)	g13;sspH1;sspH2
S. Hadar	g13;g8;sspH2
S. Hadar	gipA;sspH2
S. Hadar	g8;gipA;sspH1;sspH2;sodC1
S. Hadar	g8;gipA;sspH1;sspH2
S. Hadar	g8;nanH;sspH1;sspH2
S. Houtenae	-
S. Houtenae	sopE;sspH1;sspH2
S. Houtenae	sopE;sspH2
S. Kapemba	g8;nanH;sspH1
S. Kasenyi	g8;gtgB;sspH1;sspH2;srgA
S. Kottbus	g8;gipA;nanH;sopE;sspH2
S. Manhattan (2)	sspH1;sspH2;srgA
S. Manhattan (2)	srgA
S. Manhattan (2)	sspH2
S. Manhattan (2)	g13;gipA;srgA
S. Manhattan (2)	g13;g8;gipA;sspH2
S. Manhattan (2)	g8;sspH1;sspH2;srgA
S. Manhattan (2)	gipA;sspH2;srgA
S. Messina	sopE;sspH2
S. Monofasica	gipA;gtgB;sspH2;sodC1
S. Monofasica (3)	g8;gipA;gtgB;sopE;sspH2;sodC1
S. Monofasica	g8;gipA;gtgB;sopE;sspH1;sspH2;sodC1
S. Napoli	g13;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13;sieB;gipA;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13;sieB;gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli (8)	g13;gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13;gipA;sopE;sspH1
S. Napoli	sopE;sspH1
S. Napoli	gipA;sspH1
S. Napoli	gipA;gtgB;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli (2)	sopE;sspH1;sspH2

segue

continua

Sierotipo (n. ceppi)	Profilo di virulenza
S. Napoli (8)	g8:gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13:g8:gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13:g8:gipA;sspH2
S. Napoli	gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Reading	gipA
S. Reading	g8;nanH;sspH1;srgA
S. Rissen	sieB;sspH1;sspH2
S. Rissen	sieB:g8;sspH1;sspH2
S. Salamae (2)	sspH1
S. Salamae	g8
S. Senftenberg	sspH1;sspH2
S. Szentes (2)	g8;sspH1;sspH2
S. Szentes	g8;nanH;sspH1;sspH2
S. Thompson	sspH1;sspH2
S. Thompson	g13;sspH1;sspH2
S. Thompson (5)	sspH2
S. Typhimurium	eaC:g8;gtgB;sspH1;sspH2
S. Typhimurium	eaC:g8:gipA;sspH2
S. Typhimurium	g8;gtgB;sspH1;sspH2;sodC1;mig5;rcK;srgA
S. Typhimurium	g8:gipA;gtgB;sspH1;sspH2;sodC1;mig5;rcK;srgA
S. Typhimurium (2)	gipA;gtgB;sspH2
S. Typhimurium	gipA;sspH1;sspH2;mig5;srgA
S. Typhimurium	gipA;gtgB;sspH2;sodC1
S. Typhimurium	g13:g8:gipA;gtgB;sspH1;sspH2
S. Typhimurium (2)	sieB:g8;gtgB;sspH1;sspH2
S. Typhimurium	g8:gipA;gtgB;nanH;sspH1;sspH2;sodC1;spvC;pefA;mig5;rcK;srgA
S. Typhimurium	g8:gipA;gtgB;nanH;sspH1;sspH2;gtgE
S. Typhimurium	g8:gipA;gtgB;sspH1;sspH2
S. Typhimurium	g8;gtgB;sspH1;sspH2
S. Umbilo	gipA
S. Umbilo	sspH2;srgA
S. Veneziana	g13;sieB:g8:gipA;sopE;sspH2
S. Veneziana	g13:g8:gipA;gtgB;sspH2
S. Worthington (2)	g8;sspH1;sspH2

Tabella 22. Profilo di virulenza dei ceppi di *Salmonella* isolati da animali

Sierotipo (n.ceppi)	Profilo di virulenza
S. Agona	sieB:g8;sspH2;mig5;rcK;srgA
S. Bardo	-
S. Blockley	gtgB;sspH1;sspH2;sodC1
S. Bovismorbificans	gtgB;sspH2;sodC1
S. Brandenburg	g13:g8:gipA;sspH1
S. Bredeney	g13;sspH1;sspH2
S. Coeln (3)	g13;sspH2
S. Derby (2)	sopE;sspH1;sspH2
S. Diarizonae (4)	g13:g8:gipA;nanH;sspH1;sspH2
S. Diarizonae (6)	gipA;nanH;sspH2;sodC1
S. Enteritidis	gipA;gtgB;sopE;sspH2;mig5;rcK;srgA
S. Enteritidis	gtgB;sopE;sspH2;sodC1;spvC;mig5;rcK;srgA
S. Enteritidis	gtgB;sopE;sspH2;sodC1;spvC;pefA;mig5;rcK;srgA
S. Goldcoast	g8
S. Infantis (3)	sspH2
S. Kasenyi	-
S. Kentucky (4)	-

segue

continua

Sierotipo (n. ceppi)	Profilo di virulenza
S. Livingstone	g13;sspH1
S. London (3)	sspH2
S. Manhattan	sspH2
S. Mbandaka	gogB;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	g13;gipA;sopE;sspH1;sspH2
S. Napoli	gtgB;sopE;sspH1;sspH2
S. Ohio	sspH2
S. Reading	sopE;sspH2
S. Rissen (6)	sieB;nanH;sspH2
S. Thompson	g8;sspH1;sspH2
S. Toulon	sspH
S. Typhimurium (3)	g13;g8;gipA;sspH1;sspH2;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium (2)	gipA;gtgB;gogB;sopE;sspH1;sspH2;sodC1;spvC;pefA;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium	g13;g8;gipA;sspH1;sspH2;sodC1;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium	sieB;g8;gipA;sspH2;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium (2)	gtgB;sopE;sspH2;sodC1;spvC;pefA;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium	sieB;g8;sspH2;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium (2)	sieB;g8;sopE;sspH1;sspH2;sodC1;spvC;pefA;mig5;rcK;srG
S. Typhimurium	sieB;gtgB;sspH1;sspH2
S. Virchow (2)	sopE;sspH2
S. Y:1.8:Z10:1.5 nuovo sierotipo	g8

Di tutti i ceppi di *Salmonella* isolati durante il periodo di studio è stato analizzato il profilo di virulenza attraverso PCR considerando un panel di geni di virulenza (Tabella 23).

**Tabella 23. Geni di virulenza testati per l'identificazione del profilo di virulenza in Campania**

Gene	Descrizione
<i>gipA</i>	È responsabile della sopravvivenza di <i>Salmonella</i> nelle placche di Peyer dell'intestino tenue
<i>gtgB</i>	Codifica una proteina effettrice del TTSS regolata dalla SPI2
<i>nanH</i>	Codifica una glicoidrolasi (NANase) che taglia i residui di acido sialico presenti in oligosaccaridi e glicoproteine largamente distribuiti sulla superficie di cellule eucariotiche. La rimozione di questi residui di acido sialico soddisfa le richieste nutrizionali dei batteri e distrugge molte funzioni della cellula ospite
<i>gogB</i>	Codifica una proteina effettrice del TTSS di SPI1 e SPI2
<i>sopE</i>	Contribuisce all'invasione delle cellule epiteliali dell'ospite e al "membrane ruffling"; non è inserito nelle isole di patogenicità
<i>sodC1</i>	Codifica la superossidodismutasi Cu <sup>++</sup> /Zn <sup>++</sup> che protegge la <i>Salmonella</i> dai burst ossidativi dei macrofagi probabilmente durante la colonizzazione sistemica del sistema reticolo-endoteliale
<i>grvA</i>	Agisce diminuendo la resistenza della <i>Salmonella</i> ai prodotti tossici dell'ossigeno utilizzati nel <i>burst</i> ossidativi prodotto dai macrofagi
<i>sspH1</i>	Codifica una proteina effettrice secreta dal TTSS regolato dalla SPI1
<i>sspH2</i>	Codifica una proteina effettrice secreta dal TTSS regolato dalla SPI2
<i>spvB</i>	Codifica una actina ADP-ribosilasi nei macrofagi e destabilizza il citoscheletro
<i>srgA</i>	Codifica una disulfide ossidoriduttasi
<i>pefA</i>	Codifica le fimbriae
<i>mig5</i>	Codifica una anidrasi carbonica
<i>rck</i>	Resiste all'uccisione del complemento
<i>invA</i>	Codifica il gene che favorisce la penetrazione del batterio nelle cellule

segue

continua

Gene	Descrizione
<i>spvC</i>	È localizzato in un plasmide di virulenza
<i>viaB</i>	Codifica l'antigene Vi espresso dalla <i>Salmonella</i> Typhi
<i>eac/eae</i>	Codifica una proteina con funzione sconosciuta
<i>g8</i>	Codifica una proteina "scaffold" che ha la funzione di portare a contatto tra loro altre proteine consentendo loro di interagire. Ha solitamente più di un sito di legame per altre proteine, ed è necessaria per l'assemblaggio del capsido fagico
<i>g13</i>	Codifica l'olina, piccola proteina integrale di membrana necessaria per la lisi dell'ospite da parte della maggior parte dei batteriofagi con DNA a doppia elica
<i>sieB</i>	Impedisce l'infezione della cellula batterica ospite da parte di altri fagi litici.

## Studio nel settore medico

### Raccolta dei ceppi di *Salmonella* spp. e analisi dei dati

I dati umani sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno sezione di Portici grazie alla sua collaborazione in qualità di Laboratorio di Riferimento del Sistema di Sorveglianza EnterNet in Campania. Essendo un sistema basato sui laboratori, la rete EnterNet ha però il vantaggio di raccogliere non solo la notifica del caso ma anche i dati di sierotipizzazione, fagotipizzazione, profilo di PFGE e profili di resistenza agli antibiotici, dati molto importanti negli studi epidemiologici. I dati riportati in Tabella 24 rappresentano le salmonelle isolate nell'intero periodo di studio. Nelle specifico sono state riportate un totale di 78 salmonelle di cui 70 isolate da feci e 8 da sangue. Come si può osservare i principali sierotipi isolati nell'uomo in Campania nel periodo di studio sono stati *S. Typhimurium* (43 ceppi) seguita da *S. Napoli* (8 ceppi) e *S. Enteritidis* (7 ceppi). Solo 10/43 ceppi di *S. Typhimurium* identificati sono stati testati per determinare il fagotipo e di questi 6 sono risultati essere DT193 e 4 U311.

**Tabella 24. Distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* isolati nell'uomo (dati EnterNet) in Campania**

Sierotipo	N. isolati
<i>S. Typhimurium</i>	43
<i>S. 4,5,12:i-</i>	3
<i>S. Napoli</i>	8
<i>S. Enteritidis</i>	7
<i>S. Infantis</i>	5
<i>S. Typhi</i> (bioser)	4
<i>S. Derby</i>	3
<i>S. London</i>	1
<i>S. Rissen</i>	1
<i>S. Thompson</i>	1
<i>S. Bovismorbificans</i>	1
NN	1
<b>Totale</b>	<b>78</b>

Su tutti gli isolati è stato effettuato il test per la determinazione del profilo di resistenza (Tabella 25) e su alcuni è stata anche applicata la metodica dell'elettroforesi in campo pulsato. La determinazione dei profili di resistenza ha evidenziato una ampia variabilità. La *S. Napoli* in accordo ai dati italiani è risultata essere sensibili a tutto il panel di antibiotici saggiato. Per

quanto riguarda la *S. Typhimurium* i profili principali sono risultati essere ASSuT da solo o con l'aggiunta di altri antibiotici e ACSSuT da solo o con l'aggiunta di altri antibiotici.

**Tabella 25. Principali profili di resistenza dei ceppi di *Salmonella* isolati nell'uomo (2013-2015)**

Sierotipo	ASSuT	ASSuT+altro	ACSSuT	ACSSuT+altro	Sensibile	Altri profili
<i>S. Typhimurium</i>	12	6	3	5	6	11
<i>S. Napoli</i>					5	3
<i>S. Enteritidis</i>					3	4
<i>S. Infantis</i>						5
<i>S. Typhi</i> (bioser)					2	2
<i>S. 4,5,12:i-</i>	1	2				
<i>S. Derby</i>					1	2
<i>S. Bovismorbificans</i>					1	
<i>S. London</i>						1
<i>S. Rissen</i>						1
<i>S. Thompson</i>					1	
Non noto						1
<b>Totale</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>30</b>

Nella Tabella 26 sono riportati i principali profili di virulenza suddivisi per sierotipo ottenuti dall'analisi di tutti i 78 ceppi isolati dall'uomo. Dai risultati si evidenzia una grande variabilità nei profili di virulenza ottenuti ad eccezione della *S. Napoli* in cui prevalgono il profilo g13;gtgB;sopE;sspH1;sspH2 (7 ceppi) e il profilo gtgB;sopE;sspH1;sspH2 (1 ceppo).

**Tabella 26. Profilo di virulenza dei ceppi di *Salmonella* isolati dall'uomo (2013-2015)**

Sierotipo (n. ceppi)	Profilo di virulenza
<i>S. Typhi</i> (bioser) (1)	g13;g8;gipA;sspH1;sspH2
<i>S. Typhi</i> (bioser) (3)	g13;gtgB;sopE;sspH1;sspH2
<i>S. Napoli</i> (7)	g13;gtgB;sopE;sspH1;sspH2
<i>S. Typhimurium</i> (15)	g13;gtgB;sopE;sspH1;sspH2
<i>S. Thompson</i> (1)	g13;sspH1;sspH2
<i>S. Typhimurium</i> (22)	g8;gipA;gtgB;sspH1;sspH2;sodC1
<i>S. 4,5,12:i-</i> (3)	g8;gipA;gtgB;sspH1;sspH2;sodC1
<i>S. Typhimurium</i> (2)	g8;gtgB;sspH1;sspH2;sodC1
<i>S. Infantis</i> (5)	g8;sspH1;sspH2
<i>S. Typhimurium</i> (1)	gipA;gtgB;nanH;sspH2;sodC1
E4:3,19:g,s,t- (1)	gipA;sspH2
<i>S. Napoli</i> (1)	gtgB;sopE;sspH1;sspH2
<i>S. Enteritidis</i> (6)	gtgB;sopE;sspH2;sodC1;spvC;pefA;mig5;rcK;srG
<i>S. Typhimurium</i> (2)	gtgB;sspH1;sspH2;sodC1
<i>S. Bovismorbificans</i> (1)	gtgB;sspH2;sodC1
<i>S. Derby</i> (3)	sieB;g8
<i>S. Rissen</i> (1)	sieB;g8
<i>S. Enteritidis</i> (1)	sieB;g8;gtgB;sopE;sspH2;sodC1;pefA;mig5;rcK;srG
<i>S. Typhimurium</i> (2)	sieB;g8;gtgB;sspH1;sspH2
<i>S. London</i> (1)	sspH2

I profili di elettroforesi in campo pulsato per *S. Typhimurium* (Figura 21) e *S. Napoli* (Figura 22) ottenuti durante l'intero periodo di studio sono stati confrontati al fine di identificare la presenza di eventuali cloni circolanti.

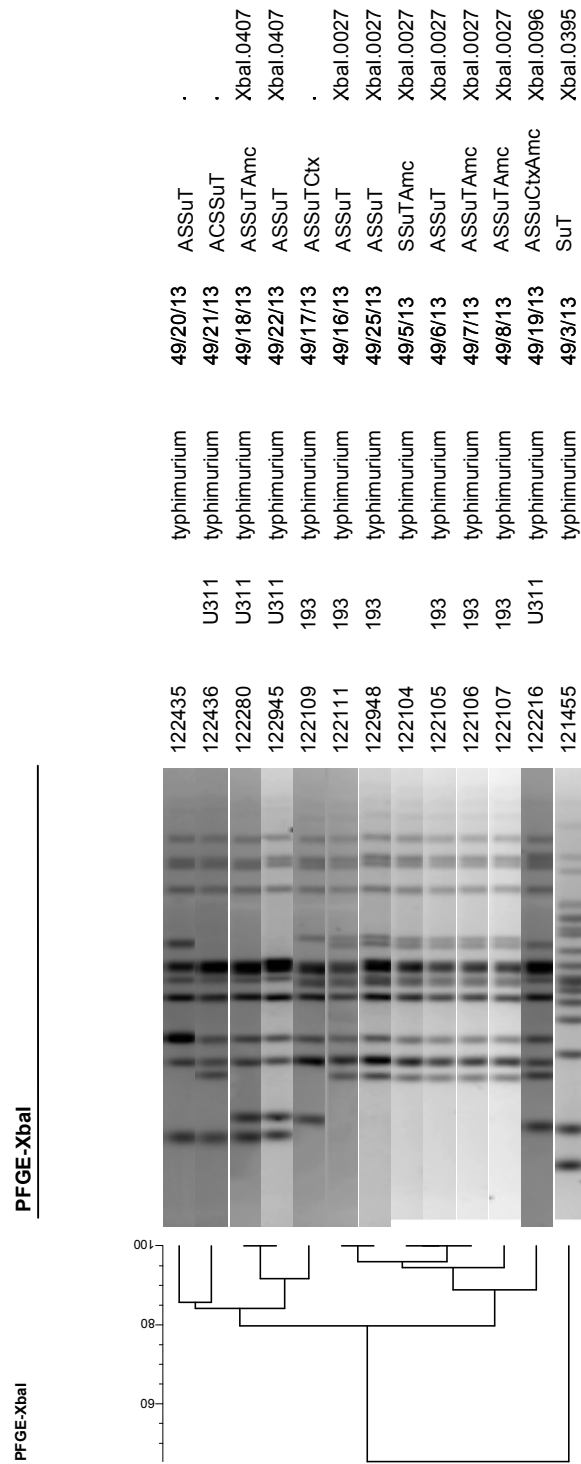


Figura 21. Dendrogramma e analisi dei cloni di *S. Typhimurim* isolati nell'uomo in Campania negli anni 2013-2015

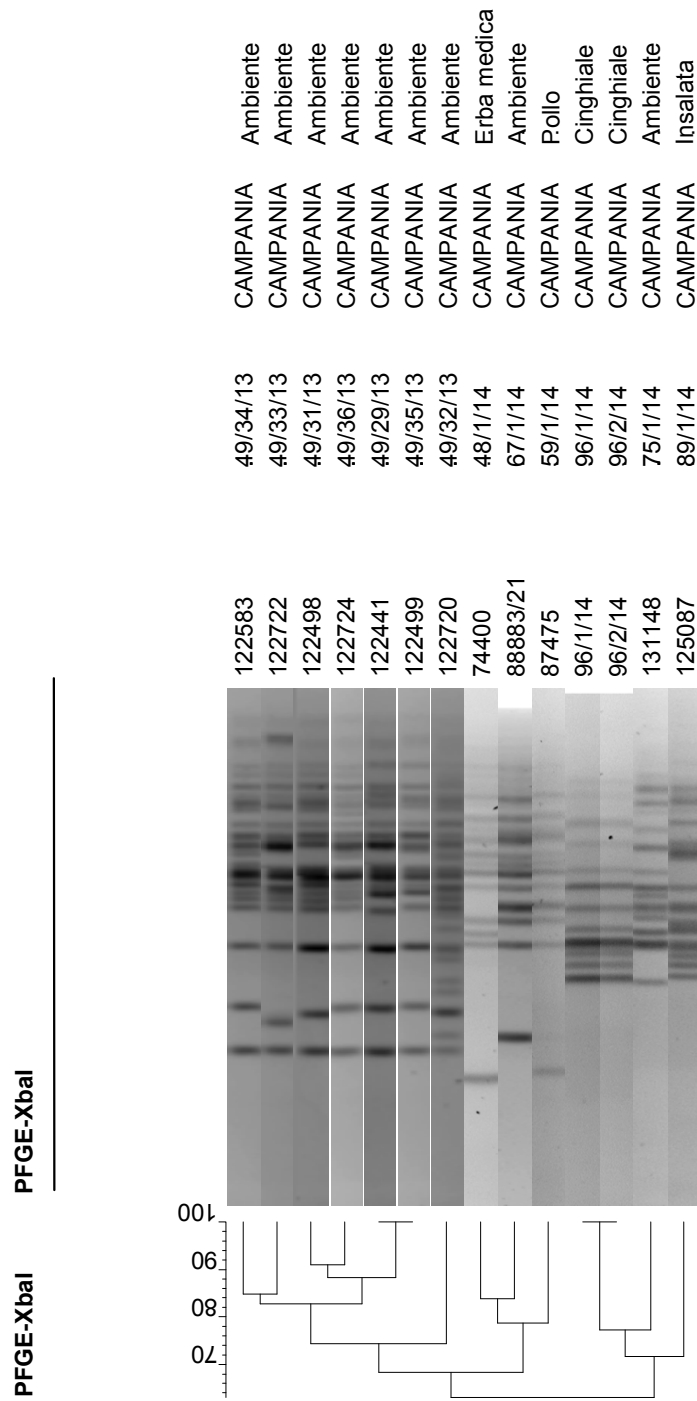


Figura 22. Dendrogramma e analisi dei cloni di *S. Napoli* isolati da varie origini in Campania negli anni 2013-2015



Gli isolati umani di *S. Napoli* sono stati inoltre confrontati con i ceppi di *S. Napoli* isolati da altre origini (specie aviarie, vegetali e acque ambientali).

Dall'immagine in Figura 21 si osservano due cloni, il primo formato da due ceppi con fagotipo U311 e profilo di elettroforesi Xba 0407 e il secondo formato da 6 ceppi con fagotipo DT193 e profilo di elettroforesi Xba 0027.

Dall'immagine in Figura 22 si osservano tre cloni, il primo formato da due ceppi ambientali, il secondo da due ceppi ambientali e il terzo da due ceppi da cinghiale.

## CONCLUSIONI

Le attività svolte all'interno delle due regioni sono state diverse in quanto si è tenuto conto sia delle differenze riguardo l'attitudine e le realtà produttive che si differenziavano tra le due regioni sia un diverso livello di partenza in quanto una serie di attività preliminari erano state svolte in Campania ma non in Calabria. Di conseguenza in regione Campania si è approfondito ed esteso quanto fatto in precedenza mentre nella regione Calabria si è pianificato ed eseguita tutta l'attività di monitoraggio e valutazione.

L'approccio integrato proposto in questo progetto ha evidenziato i collegamenti tra il compartimento ambientale (acque superficiali) e la produzione vegetale, mentre i collegamenti tra ambiente, vegetali e produzione zootecnica sono stati limitati. In particolare riguardo alle salmonelle si è visto come un sierotipo di rilievo, *S. Napoli*, abbia mostrato la sua diffusione nell'ambiente e la capacità attraverso varie vie inclusi alimenti di origine vegetale di infettare l'uomo. L'isolamento di salmonelle si è verificato prevalentemente nei mesi estivi/autunnali confermando l'andamento epidemiologico tipico per questo enteropatogeno. *Salmonella* è stata isolata in diverse specie animali, sia domestiche sia selvatiche, diverse tipologie di vegetali e acque superficiali. Per quanto riguarda la ricerca dei *E.coli* enteropatogeni, questa attività è stata svolta soltanto in Calabria. Il numero di isolati di questo patogeno è risultato essere molto più elevato rispetto *Salmonella* e in tutto il periodo dell'anno.

La parte che ha riguardato la raccolta dei ceppi di *Salmonella* isolati da casi umani nella regione Campania è stato agevolato dal fatto che esiste già presso l'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno Sezione di Portici un Laboratorio che fa parte della rete di Sorveglianza EnterNet e che svolge questo compito da qualche anno. In Calabria invece non vi è nessun laboratorio di riferimento regionale che svolge attività di coordinamento e raccolta degli isolati, pertanto si è dovuto attivare un Sistema di Sorveglianza dedicato che ha consentito di acquisire e rendere disponibili dati sull'incidenza dei casi umani di salmonellosi per una Regione che a livello nazionale presenta una delle più basse frequenze di segnalazioni. Sebbene questo rappresenti un risultato positivo, appare necessario fare alcune considerazioni in relazione alla capacità del sistema di rilevare il reale carico di malattia. La rappresentatività dei dati di incidenza per patologia rilevati dai sistemi di sorveglianza è un aspetto fondamentale al fine di indirizzare gli interventi sanitari verso le fonti di maggior rischio per la salute pubblica e di valutare l'effetto delle strategie di controllo messe in atto. Diversi studi hanno affrontato il problema della quantificazione del livello di sottostima delle Malattie a Trasmissione Alimentare (MTA) che, in proporzioni variabili, rappresenta un problema condiviso dai paesi ad alto tenore socio-economico, soprattutto in considerazione di un continuo incremento, tale da renderlo ancora oggi uno dei più rilevanti problemi di sanità pubblica a livello mondiale.

I dati di incidenza delle MTA ad eziologia infettiva rappresentano una sottostima dei reali casi di malattia correlata principalmente a due fenomeni: la sottodiagnosi e la sottotifica. Questo aspetto è emerso anche nel corso dell'attività di sorveglianza condotta nell'ambito del progetto: in presenza di più casi di malattia nell'ambito dello stesso nucleo familiare, i medici di medicina generale e/o i pediatri libera scelta (MMG/PLS) preferibilmente prescrivevano la terapia antibiotica empirica piuttosto che l'esame microbiologico volto alla ricerca di *Salmonella* spp. Solo la gravità delle manifestazioni cliniche, tali da richiedere l'ospedalizzazione, o la presenza di categorie fragili (bambini, anziani), sembrano in grado di influenzare un appropriato comportamento diagnostico da parte dei medici.

Un altro fattore in grado di incidere negativamente sulla possibilità di diagnosticare e classificare correttamente i casi di malattia giunti all'osservazione medica è rappresentato dalle

capacità diagnostiche dei laboratori che possono differire anche in modo significativo. Anche nella presente rilevazione alcune delle segnalazioni giunte al centro di riferimento erano definite “incerte” da parte dei laboratori periferici: le diverse prove biochimiche alle quali i ceppi segnalati sono stati sottoposti presso il laboratorio del centro di riferimento hanno consentito di confermare la fondatezza dei dubbi e di escludere la positività per *Salmonella* spp. Inoltre, problematiche legate alla disponibilità di materiali possono influenzare negativamente la capacità diagnostica dei laboratori. Quello della sottostima è un problema comune a tutti i sistemi di sorveglianza: in Italia, è stato quantificato per tutte le MTA nell’ordine di 1 caso notificato ogni 103 casi di malattia e, per le infezioni da *Salmonella* spp., in 1 caso notificato ogni 17 casi di infezione. È possibile ipotizzare che l’entità della sottostima dei reali casi di malattia rilevata dal sistema di sorveglianza sia in linea con quella nazionale. Questa considerazione è supportata dal confronto dei dati rilevati dal sistema di sorveglianza attivato in Calabria con i dati nazionali, sia in relazione alla distribuzione per sesso e per età che per quel che riguarda l’andamento temporale e i sierotipi più frequentemente isolati dai casi umani di infezione da *Salmonella* spp.

La riduzione dei casi rilevati nel secondo anno di attività rispetto al primo, solo in parte trova giustificazione nella ridotta circolazione di *Salmonella* spp., mentre non è da escludere che sia, più probabilmente, da ricondurre ad un problema di sottosegnalazione da parte dei laboratori della rete, nonostante le attività svolte dal centro di riferimento per mantenere e incentivare la collaborazione dei laboratori presenti sul territorio (periodico contatto telefonico, invio di un report annuale con i risultati degli isolamenti effettuati dai diversi laboratori).

In conclusione, la valutazione del sistema di sorveglianza sulle infezioni da *Salmonella* spp., per quanto limitata nei risultati, ha fornito l’opportunità di un primo approccio critico sulle modalità organizzative del sistema e sulle capacità del sistema medesimo di mettere a disposizione informazioni utili per interventi di sanità pubblica. Dai risultati della sorveglianza emerge come le infezioni gastroenteriche da *Salmonella* spp. costituiscono ancora un problema sanitario importante sebbene sottostimato e che impone di mantenere elevata l’attenzione per tempestivi interventi di sanità pubblica, soprattutto in considerazione dei processi di globalizzazione del commercio e abbattimento delle frontiere consentendo il libero movimento di alimenti e persone attraverso paesi con situazioni sanitarie estremamente diversificate.

In generale numerosi sono gli aspetti critici emersi durante le attività di sorveglianza in entrambe le regioni. In particolare, la scarsa partecipazione attiva di una quota rilevante di laboratori afferenti alle reti rende necessari interventi volti a rafforzare tanto il coinvolgimento dei referenti periferici nelle attività di conferma e di segnalazione dei casi quanto il coinvolgimento degli operatori sanitari che svolgono la loro attività sul territorio (MMG, PLS, medici ospedalieri) nelle attività di rilevazione e di conferma dei casi. Infine, la necessità di disporre di dati quantitativamente e qualitativamente più solidi, pone l’accento sulla opportunità di conduzione di studi epidemiologici ad hoc per l’individuazione dei determinanti di rischio.

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol* 2010;12:2385-97.
- Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Renschmidt C, Wilking H. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* 2011;365:1763-70.
- Del Manso M, De Crescenzo M, Bella A, D'Ancona P, Giannitelli S, Lana S, Salmaso S, Rizzo C. Food-borne illnesses: a survey of regional reference laboratories in Italy. *Ig Sanita Pubbl* 2009;65:573-82.
- Dionisi AM, Filetici E, Owczarek S, Arena S, Benedetti I, Lucarelli C, Luzzi I, Scavia G, Minelli F, Ciaravino G, Marziano L, Caprioli A. ENTER-NET: Sorveglianza delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua. Rapporto dell'attività 2007-2009. *Not Ist Super Sanità* 2011;24:3-10.
- Edge VL, Odoi A, Fyfe M, MacDougall L, Majowicz SE, Doré K, Flint JA, Boom N, Muchaal PK, Sockett PN. Physician diagnostic and reporting practices for gastrointestinal illnesses in three health regions of British Columbia. *Can J Public Health* 2007;98:306-10.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013;4:3129.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014;2:3547.
- Gardner TJ, Fitzgerald C, Xavier C, Klein R, Pruckler J, Stroika S. Outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw peas. *Clin Infect Dis* 2011;53:26-32.
- Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Caprioli A, Ivarsson S, Hedenström I, Luzzi I. Virulotyping of *Salmonella enterica* serovar Napoli strains isolated in Italy from human and nonhuman sources. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:997-1003.
- Graziani C, Mughini-Gras L, Owczarek S, Dionisi A, Luzzi I, Busani L. Distribution of *Salmonella enterica* isolates from human cases in Italy, 1980 to 2011. *Euro Surveill* 2013;18(27).
- Haagsma JA, Geenen PL, Ethelberg S, Fetsch A, Hansdotter F, Jansen A, Korsgaard H, O'Brien SJ, Scavia G, Spitznagel H, Stefanoff P, Tam CC, Havelaar AH; Med-Vet-Net Working Group. Community incidence of pathogen-specific gastroenteritis: reconstructing the surveillance pyramid for seven pathogens in seven European Union Member States. *Epidemiol Infect* 2013;141:1625-39.
- Herman KM, Hall AJ, Gould LH. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. *Epidemiol Infect* 2015;20:1-11.
- Huhulescu S, Kiss R, Brettlecker M, Cerny RJ, Hess C, Wewalka G, Allerberger F. Etiology of acute gastroenteritis in three sentinel general practices, Austria 2007. *Infection* 2009;37:103-8.
- Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. Persistence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathog Dis* 2004;1:27-35.
- Launders N, Locking ME, Hanson M, Willshaw G, Charlett A, Salmon R, Cowden J, Adak GK. A large Great Britain-wide outbreak of STEC O157 phage type 8 linked to handling of raw leeks and potatoes. *Epidemiol Infect* 2015;4:1-11.
- Mercanoglu Taban B, Halkman AK. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe* 2011;17:286-7.

- Mughini-Gras L, Graziani C, Biorci F, Pavan A, Magliola R, Ricci A, Gilli G, Carraro E, Busani L. Surveillance of acute infectious gastroenteritis (1992-2009) and food-borne disease outbreaks (1996-2009) in Italy, with a focus on the Piedmont and Lombardy regions. *Euro Surveill* 2012;17(8):pii=20098.
- Mukherjee A, Speh D, Diez-Gonzalez F. Association of farm management practices with risk of *Escherichia coli* contamination in pre-harvest produce grown in Minnesota and Wisconsin. *Int J Food Microbiol* 2007;120:296-302.
- Nygård K, Lassen J, Vold L, Andersson Y, Fisher I, Löfdahl S. Outbreak of *Salmonella* Thompson infections linked to imported rucola lettuce. *Foodborne Pathog Dis* 2008;5:165-73.
- Rodríguez-Caturla MY, Valero A, Carrasco E, Posada GD, García-Gimeno RM, Zurera G. Evaluation of hygiene practices and microbiological status of ready-to-eat vegetable salads in Spanish school canteens. *J Sci Food Agric* 2012;92(11):2332-40.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17:7-15.
- Scavia G, Baldinelli F, Busani L, Caprioli A. The burden of self-reported acute gastrointestinal illness in Italy: a retrospective survey, 2008-2009. *Epidemiol Infect* 2012;140:1193-206.
- World Health Organization. *WHO Initiative to estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. Second formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG) Geneva, 17–21 November 2008*. Geneva: WHO; 2009.



**APPENDICE A**  
**Metodi di tipizzazione di *Salmonella* spp.**





## A1. Tipizzazione sierologica

La tipizzazione sierologica viene effettuata mediante agglutinazione, con metodica rapida su vetrino o lenta in provetta. Entrambe le metodiche si applicano per l'identificazione degli antigeni somatici O e degli antigeni flagellari H, nonché dell'antigene di virulenza Vi. La scelta del metodo dipende dalle esigenze del laboratorio: il metodo dell'agglutinazione rapida è veloce e apparentemente più semplice, ma richiede una certa abilità ed esperienza dell'operatore, mentre, il metodo dell'agglutinazione lenta è più complesso e dispendioso ed è consigliabile se il laboratorio tratta costantemente un numero programmabile di tipizzazioni.

La tipizzazione prevede operativamente le seguenti fasi:

1. Agglutinazione somatica O
2. Agglutinazione flagellare H (prima agglutinazione)
3. Separazione, eventuale, tra fase 1 e fase 2
4. Agglutinazione flagellare H (seconda agglutinazione)

Vista la numerosità di sierotipi presenti nello schema di Kauffmann-White si consiglia prima di addentrarsi in queste tecniche, di valutare in base alle risorse disponibili nel laboratorio, il livello di tipizzazione che si vuole raggiungere. È importante inoltre fare alcune considerazioni, se ci riferiamo ad isolati da campioni umani basterebbe utilizzare gli antisieri specifici per i sierotipi più frequentemente implicati nella patologia umana che, rispetto la grande quantità esistente sono in numero limitato. Lo stesso WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ha definito che, in generale, i principali sierotipi isolati sono quelli appartenenti ai gruppi O4, O7, O8, O9, O3,10, O1,3,19 e con fase ciliare b, d, i, E, G, k, y, L, r, z10, z29 e l; inoltre se abbiamo ad esempio isolati appartenenti al gruppo O4 e O9, si può ipotizzare che i sierotipi siano *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, rispettivamente. Accorgimenti per ottenere un miglior risultato sono l'utilizzo di colture fresche per ottenere una migliore agglutinazione e il passaggio su una piastra di agar nutriente semisolido in quanto le colture vecchie possono perdere la mobilità; dopo incubazione a +37°C, con la piastra posizionata in modo da avere il coperchio rivolto verso l'alto, si preleva per il test la patina batterica dalla parte periferica della piastra stessa.

La tecnica di agglutinazione veloce su vetrino prevede l'uso di batteri trapiantati da terreni nutritivi come il Tryptose Agar. Operativamente si pone una goccia di antisiero su un vetrino e poi con la punta dell'ago, si procede a trasportare la patina batterica direttamente sulla goccia di siero e si mescola con movimento circolare, in modo da disperdere i batteri. La patina microbica viene stemperata dalla periferia della goccia verso il centro fino ad inglobare tutto il siero. La miscelazione viene completata con movimenti di oscillazione del vetrino. Dopo qualche minuto si osserva la reazione ad occhio nudo mediante una lente concava e, nel caso di reazione positiva, si osserveranno piccoli granuli bianchi, omogeneamente dispersi nell'intera goccia di siero, divenuta trasparente attorno alle granulazioni. In caso di reazione negativa i batteri rimangono in sospensione con un aspetto lattiginoso e opaco.

Lo schema di identificazione più comunemente applicato (50, 51) prevede l'uso iniziale di sieri polivalenti che forniscono delle indicazioni generali e, successivamente, di sieri monovalenti specifici nei confronti sia degli antigeni somatici O sia degli antigeni flagellari H.

Operativamente le fasi sono:

1. saggio delle colonie con antisiero polivalente somatico O (A-S);
2. saggio delle colonie con antisiero monovalente somatico O;
3. saggio delle colonie con antisiero polivalente flagellare H (poli H fasi 1 e 2);
4. saggio delle colonie con antisiero monovalente flagellare.

Una completa definizione del sierotipo prevede, se si tratta di *Salmonella* bifasica, il riconoscimento di entrambe le fasi ciliari 1 e 2 che non possono essere evidenziate contemporaneamente durante la prima agglutinazione, per cui si procederà ad effettuare la cosiddetta "inversione di fase". I metodi più conosciuti sono quello di Swen Gard e il metodo di Craigie. Il primo consiste nel seminare il ceppo al centro di una piastra contenente un terreno nutritivo agarizzato semisolido (Swen Gard), addizionato con una piccola quantità di siero anti-*Salmonella* corrispondente alla fase H conosciuta (e quindi da inibire). Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore, la *Salmonella*, essendo mobile, si svilupperà formando una patina batterica di forma circolare, alla cui periferia saranno presenti cellule batteriche dotate di fase

sierologica H differente da quella iniziale (passaggio da fase 1 a fase 2 o viceversa). Il metodo di Craigie segue lo stesso principio del precedente ma viene effettuato in provetta. Dopo aver ottenuto l'inversione di fase si ripete l'agglutinazione con gli antisieri H. Nel metodo dell'agglutinazione lenta per la ricerca degli antigeni H, ogni ceppo viene seminato in due provette, contenenti rispettivamente 3 mL di Trypticase Soy Broth (TSB) per la ricerca della fase "H", e 4 mL del medesimo terreno per la ricerca della fase "O". La provetta contenente 3 mL viene incubata a 37°C per 18-24 ore, e successivamente addizionata con un ugual volume di soluzione fisiologica formulata all'1%. La provetta contenente 4 mL viene incubata a 37°C per 3 ore, e successivamente sottoposta ad attivazione mediante bollitura. Si procede quindi al test di agglutinazione lenta in piastra, utilizzando per ogni siero la diluizione d'uso precedentemente stabilita testando ceppi di riferimento con diluizioni scalari dei diversi sieri. Per tale prova esistono dei pool di sieri introdotti da Spicer-Edwards che consentono, mediante varie combinazioni, di risalire a 35 fattori antigenici (Tabella A1).

**Tabella A1. Rappresentazione degli antigeni flagellari H ottenuti mediante i pool di sieri di Spicer-Edwards**

Antigeni H	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
a	+	+	+	-
b	+	+	-	+
c	+	+	-	-
d	+	-	+	+
e,h	+	-	+	-
G Complex*	+	-	-	+
j	+	-	-	-
k	-	+	+	+
r	-	+	-	+
y	-	+	-	-
z	-	-	+	+
Z <sub>4</sub> Complex**	-	-	+	-
Z <sub>10</sub>	-	-	-	+
Z <sub>29</sub>	-	+	+	-

Antigene H	Nome del pool	Numero del pool
e, n, x, : e, n, z15	EN complex	5
l, v : l, w : l, z13; l, z28	L complex	6
1,2 ; 1,5 : 1,6 ; 1,7 : z6	1 complex	7

\* comprende gli antigeni f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, t; g, p; g, p, s; g, p, u; g, q; g, s, t; g, t, m, p, t, u, m,  
 \*\* comprende gli antigeni z<sub>4</sub>, z<sub>23</sub>; z<sub>4</sub>, z<sub>24</sub>; z<sub>4</sub>, z<sub>32</sub>

## A2. Tipizzazione fagica

Se si ha l'esigenza di confrontare ceppi appartenenti allo stesso sierotipo e/o di effettuare indagini epidemiologiche, si ha la necessità di applicare tecniche molto più specifiche della sierotipizzazione. La fagotipizzazione permette infatti di differenziare i vari sierotipi in sottotipi (fagotipi) in base alla diversa sensibilità nei confronti di un pannello di batteriofagi. Questa tecnica sfrutta la caratteristica che hanno alcuni batteri di possedere recettori specifici per determinati fagi sierotipo specifici che, quindi, possono penetrare, replicarsi nella cellula e indurle la lisi. La modalità di esecuzione e di interpretazione della tecnica può basarsi su diversi schemi ma, quelli più comunemente utilizzati sono quelli indicati dal *Public Health Laboratory Service*, Colindale, Londra. È sicuramente una metodica molto utile ma ha come svantaggio quello di dipendere molto dalla capacità interpretativa dell'operatore ed è quindi anche di difficile standardizzazione. Inoltre, i reagenti non sono in commercio, e solo presso i laboratori di riferimento nazionali è possibile effettuare la fagotipizzazione. Operativamente l'isolato viene seminato

su piastre di *Trypticase Soy Agar* (TSA) e incubato a 37°C per 18-24 ore. Successivamente si trasferisce con un'ansa la patina batterica in 4 mL di *Nutrient Broth Double Strength* (DIFCO) e si incuba per 2 ore a 37°C. Contemporaneamente si trasferiscono i fagi opportunamente diluiti in micropiastre. Le brodocolture vengono seminate su piastre di *Nutrient Agar* (DNA), a cui vengono aggiunti i fagi in modo da formare delle gocce ben delimitate. Le piastre di DNA inoculate vengono incubate a 37°C per 18-24 ore. Alla fine dell'incubazione si effettua la lettura. La presenza di lisi in corrispondenza del fago viene evidenziata mediante la formazione di una placca circolare in cui manca la patina batterica, o dalla presenza di placche di numero e dimensioni variabili in caso di lisi incompleta. La lettura e l'interpretazione dei risultati viene effettuata secondo lo schema proposto dall'*International Phage-typing Reference Laboratory* (Health Protection Agency, London, UK).

### A3. Tipizzazione molecolare

L'utilizzo di metodiche molecolari consente, mediante il confronto del DNA, di capire se isolati di *Salmonella* possono derivare dallo stesso clone cellulare. Tra le tecniche più diffuse ricordiamo l'analisi dei profili plasmidici, l'analisi ribosomale, l'AFLP (*Amplified Fragment- Length Polymorphism*) o la sua versione fluorescente la fAFLP e la VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Un enorme aiuto alle indagini epidemiologiche nel campo della microbiologia degli alimenti è quello fornito dalla tecnica dell'impronta del DNA (o *DNA fingerprinting*) mediante la metodica PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). Il DNA viene frammentato grazie ad endonucleasi di restrizione e poi corso su un gel d'agarosio per separare i frammenti originati e misurarne così il numero e la dimensione. Quello che si ottiene è un profilo di restrizione unico per ciascun clone, costituito da bande evidenziate mediante fluorescenza dalla colorazione con etidio bromuro. Tale profilo di restrizione permette l'individuazione univoca del ceppo esaminato e il confronto con profili ottenuti da altri ceppi della stessa specie. Il più comune metodo di separazione di molecole di DNA da 0,1 Kb a 30 Kb è il gel-elettroforesi orizzontale. Questa tecnica prevede il caricamento dei campioni di DNA su un gel d'agarosio a diverse concentrazioni e utilizza un campo elettrico continuo e omogeneo che obbliga il DNA, carico negativamente in quanto acido, a spostarsi, in presenza di una soluzione acquosa, verso il polo positivo. Poiché tutte le molecole di DNA hanno uno stesso rapporto carica/massa, saranno le caratteristiche del gel a determinare la velocità di migrazione del DNA e quindi il grado di separazione tra molecole piccole e grandi. Quando la misura del DNA è al di sopra delle 30 Kb, si utilizza l'elettroforesi su gel in campo pulsato (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* o PFGE). Tale tecnica ideata da Schwartz e Cantor nel 1983 utilizza invece due campi elettrici con differenti angolazioni, applicati alternativamente al gel di agarosio per periodi di tempo definiti, dell'ordine di secondi. L'azione del primo campo causa uno stiramento lungo il piano orizzontale delle molecole di DNA e il loro movimento nel gel. L'interruzione di questo campo e l'azione del secondo fa sì che le molecole si muovano nella nuova direzione. Tenendo presente che per una molecola a catena lunga lineare esiste una relazione tra il cambiamento conformazionale indotto da un campo elettrico e la lunghezza della molecola stessa, le molecole più piccole si riallineranno più velocemente nel nuovo campo elettrico e quindi continueranno a muoversi attraverso il gel. Molecole più grandi al contrario impiegheranno più tempo per allinearsi. Variando continuamente la direzione del campo elettrico sarà quindi possibile separare le molecole quelle più piccole da quelle più grandi. La PFGE permette di separare frammenti di DNA fino a 10 Mb. La tecnica prevede l'utilizzo di terreno liquido o piastra di TSA (*Tryptone Soya Agar*) su cui vengono fatti crescere gli isolati; le cellule batteriche vengono raccolte direttamente dalle piastre oppure centrifugate e lavate per eliminare eventuali sedimenti. Successivamente vengono risospese in CSB (*Cell Suspension Buffer*: 100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8) sino ad ottenere una densità cellulare di 0,38-0,44 O.D. (unità di densità ottica) a 450 nm. Poiché il DNA cromosomico può danneggiarsi facilmente, le cellule batteriche vengono inglobate in una matrice d'agarosio a forma di blocchetti. Praticamente si prepara un gel d'agarosio all'1,6% o al 2% in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) e si lascia scendere la temperatura del gel fino a 50°C. Contemporaneamente si aggiunge nella sospensione cellulare Proteinasi K alla concentrazione finale di 0,5 mg/mL e si mescola con l'agarosio in modo da ottenere un rapporto 1:1; si cola in uno stampo e si lascia solidificare. Ogni blocchetto d'agarosio che adesso contiene le cellule batteriche viene lasciato per almeno 2 ore in una soluzione di lisi (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% Sarkosyl, 0,1

mg/mL Proteinasi K, pH8) all'interno di un bagnetto a 54°C. Il blocchetto d'agarosio con le cellule incluse viene quindi lavato due volte utilizzando acqua distillata sterile alla temperatura di 50°C; mentre il terzo lavaggio viene effettuato in TE alla stessa temperatura. I blocchetti così ottenuti possono essere conservati per molti mesi a 4°C per successive analisi. Quando si vorrà procedere all'analisi del DNA, uno dei tasselli conservati dello spessore di 3 mm viene posto a contatto con 50-100 µL di una soluzione contenente buffer di reazione e 0,2-0,8 U/µL dell'enzima XbaI. Si lascia a 37°C per almeno 4 ore. Si prepara un gel d'agarosio all'1% o all'1,2% usando TBE 0,5X e si caricano i campioni facendoli correre a determinate condizioni: 6V/cm (200V), *pulse time* 2-64 s, tempo di corsa dalle 18 alle 22 ore alla temperatura di 14°C. Le variazioni di *pulse time*, ossia nel tempo d'inversione del campo elettrico, influenzano la taglia delle bande che è possibile separare. Per esempio correndo il gel a 5,4 V/cm e con un *pulse time* di 90 s due frammenti di 1,5 Mb e 2,2 Mb appaiono come un'unica banda. Se invece lavoriamo con un tempo d'inversione di 120 s gli stessi due frammenti risulteranno separati. Per visualizzare le bande il gel viene colorato con etidio bromuro e osservato al transilluminatore UV. Verrà scattata una fotografia che sarà utilizzata per l'analisi e l'interpretazione dei profili; verrà salvata in formato TIFF e i files analizzati con un programma informatico in grado di confrontare le diverse bande ottenute ed effettuare eventuali correlazioni tra i diversi ceppi in modo da capire se vi è una discendenza clonale.

## A4. Test di sensibilità agli antibiotici

La determinazione della sensibilità agli antibiotici consente di valutare l'efficacia in vitro di un farmaco nei confronti di un batterio permettendo così dal punto di vista clinico, di dare informazioni sull'antibiotico più efficace da utilizzare in terapia e, dal punto di vista epidemiologico, di monitorare l'evoluzione della resistenza batterica. I metodi utilizzabili sono molti ma al fine di rendere comparabili i risultati provenienti dai vari laboratori a livello mondiale, si preferiscono metodi standardizzati. Standardizzare significa rendere omogenei criteri di esecuzione quali: utilizzo di isolati puri, densità di inoculo, condizioni di incubazione, metodo di lettura. La standardizzazione di questi criteri consente infine l'interpretazione biologica e clinica del risultato. I risultati di un test possono essere la Minima Concentrazione Inibente (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) definita come la minima concentrazione, in un range di diluizioni di antibiotico, che inibisce la crescita batterica; oppure in mm che misurano il diametro di un alone di inibizione. I criteri di interpretazione dei risultati quantitativi si basano su *breakpoint* (indicati e aggiornati dal CLSI e altri) definiti in modo da distinguere tre categorie: Sensibile, Intermedio e Resistente (S, I, R). La sensibilità di un batterio ad un antibiotico è definita come la capacità di un farmaco di inibire la crescita batterica al dosaggio considerato. I batteri che sono inibiti a dosaggi superiori sono considerati intermedi, mentre sono resistenti quelli non inibiti dall'antibiotico testato.

Il test utilizzato è stato il test in agar diffusione con dischetto (Kirby Bauer).

Il metodo della diffusione in agar valuta la capacità di un antibiotico, contenuto su dischi o su strisce, di inibire la crescita di un microrganismo su piastre di agar. Si tratta di un metodo semplice, rapido ed economico, ed è quello più comunemente usato. Risente ovviamente di numerose variabili che possono influenzare i risultati, quali:

- la preparazione dell'inoculo batterico;
- la composizione e il pH del terreno;
- il tempo e la temperatura di incubazione;
- la capacità di diffusione del farmaco.

Indipendentemente dal metodo usato, la validazione del risultato del test viene effettuata testando in ogni prova, contemporaneamente ai campioni da esaminare, anche i ceppi di riferimento idonei i quali devono fornire risultati entro i valori definiti dal sistema distandardizzazione utilizzato.

### Metodo di diffusione in Agar (Kirby Bauer)

La metodica è la seguente:

- preparare una sospensione batterica in brodo di crescita (*Brain Heart Infusion*) partendo da tre o quattro colonie ben isolate;

- incubare in termostato a 37°C fino a raggiungere una torbidità di 0,5 Mc Farland (1x10<sup>8</sup> CFU);
- seminare su piastra di agar mediante tampone sterile (tre volte roteando la piastra di 60°);
- deporre entro quindici minuti dalla semina i dischetti di antibiotico;
- capovolgere le piastre per evitare la condensa e incubarle a 37°C per 16-18 ore;
- lettura dei risultati.

In base al numero di antibiotici da testare possono essere usate piastre tonde da 90 mm oppure quadrate da 120 mm (fino a 16 dischetti). La scelta del terreno dipende dal batterio da testare; in genere si usa MHA II mentre si aggiunge sangue per batteri esigenti come *Streptococchi* spp., *Mannhemia* spp. e altri. I dischetti sono impregnati di antibiotico a concentrazione nota, hanno un diametro di 6 mm e devono essere posti sull'agar ad una distanza di 15 mm dal bordo e di almeno 20 mm tra loro per evitare problemi nelle letture. Il risultato è la formazione di un alone di inibizione circolare il cui diametro, espresso in mm, può essere letto o manualmente tramite righello oppure in automatico con apparecchiature. Dal confronto dei diametri con i riferimenti riportati sul CLSI, si definisce per ogni antibiotico la categoria del microrganismo, sensibile (S), intermedio (I), resistente (R). Difficoltà di interpretazione dei risultati possono essere legate a:

- crescita di colonie nell'alone di inibizione quali mutanti resistenti o colonie estranee dovute ad inquinanti, si consiglia di controllare il ceppo iniziale;
- presenza nell'alone di patina poco visibile dovuta non a fenomeni di resistenza ma principalmente al tipo di antibiotico e al batterio in esame (esempio per *Salmonella* Tmp, Su, Sxt);
- presenza di doppio alone che può essere dovuto sia ad inquinamento che ad eventuale semina su piastre umide, si consiglia di ripetere il test;
- presenza di aloni con contorno sfrangiato, può dipendere sia dal rapporto tra batterio e antibiotico che da una semina non corretta;
- patina non uniforme sulla piastra dovuta ad una semina non corretta, ripetere il test;
- presenza come nel caso di *Proteus*, di un sottile velo che può penetrare oltre la zona di inibizione, ignorare la sciamatura e considerare solo il margine esterno;
- sovrapposizione di aloni dovuti a diametri molto grandi, il test va ripetuto distanziando ulteriormente i dischetti.



**APPENDICE B**  
**Metodo di rilevamento di *Salmonella* spp.**  
**tramite PCR in Real-Time**

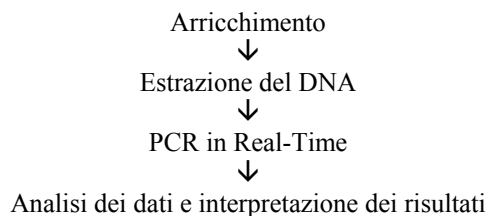




Rispetto al metodo batteriologico tradizionale spesso lungo e costoso, il metodo iQ-Check™ *Salmonella* II è un test qualitativo semplice e rapido che permette la rilevazione di sequenze di DNA specifiche di *Salmonella* spp. nei prodotti per l'alimentazione umana e animale e nei campioni ambientali tramite la tecnica di polimerizzazione a catena (PCR) in Real-Time. Le sequenze di DNA specifiche del genere *Salmonella* vengono amplificate e rilevate simultaneamente per mezzo di sonde fluorescenti. Possono essere processati fino a 94 campioni, con rischi minimizzati di contaminazione e una procedura di facile impiego. L'utilizzo di questo test consente di ottenere un risultato a poche ore dalla fase di pre-arricchimento del campione.

I reagenti PCR pronti all'uso contengono i *primer* e una sonda di DNA specifici per *Salmonella* spp., insieme alla DNA polimerasi e ai nucleotidi. Il rilevamento e l'analisi dei dati sono ottimizzati per l'utilizzo con un termociclature per la PCR in tempo reale Bio-Rad, come il Chromo4™, il MiniOpticon™ o il CFX96™. La PCR è una tecnica molto potente utilizzata per produrre molte copie del DNA target. Nel corso della reazione di PCR, i *primer* si legano alla regione target, poi la polimerasi catalizza la loro estensione nel senso 5'-3' utilizzando i desossinucleotidi trifosfati (dNTP), creando così una sequenza complementare di DNA, chiamata "amplicone". Nella PCR in Real-Time, sonde specifiche sono utilizzate per rilevare il DNA durante l'amplificazione, dall'ibridazione agli ampliconi. Queste sonde sono legate a un fluoroforo che emette fluorescenza solo quando ibridizzate alla sequenza target; nei kit iQ-Check™ *Salmonella* II, FAM è il fluoroforo legato alla sonda ibridizzata alla sequenza di DNA specifica di *Salmonella* spp. In assenza del DNA target, non sarà rilevata fluorescenza e il campione risulterà negativo. Con l'aumento della quantità di ampliconi a ogni ciclo d'amplificazione, aumenta anche l'intensità della fluorescenza. Durante ciascun ciclo PCR, nella fase di annealing, il modulo ottico o il rivelatore misura questa fluorescenza, mentre il software associato traccia l'intensità della fluorescenza rispetto al numero dei cicli. Questo metodo permette una determinazione facile della presenza o assenza di *Salmonella* spp. in un campione. Per monitorare la corretta amplificazione del DNA, in ciascun tubo di reazione un DNA sintetico, detto "controllo interno" è incluso nella miscela di reazione. Questo controllo viene amplificato, contemporaneamente alla sequenza target di *Salmonella*, con una sonda specifica che è marcata con un secondo fluoroforo. Consente la validazione di tutti i risultati negativi.

Questo test consente il rilevamento di *Salmonella* in tutti i prodotti destinati all'alimentazione umana e animale e nei campioni ambientali precedentemente arricchiti in acqua peptonata tamponata. Il metodo comprende quattro fasi principali:



### Arricchimento del campione

I terreni di arricchimento devono essere portati alla temperatura d'incubazione appropriata prima dell'utilizzo.

Omogeneizzare n. g di campione in n. mL di acqua peptonata tamponata preriscaldata (es. 25 g in 225 mL) in un sacchetto per Stomacher con filtro incorporato.

Incubare, senza agitare, per 21 h e alla temperatura di 37°C.

Trasferire 100 µL di sospensione prearricchita decantata in un tubo conico con tappo a vite o safe-lock da 1,5 mL, o in un pozzetto di una piastra deepwell, contenente 100 µL di lysis reagent, ovvero del reagente A come fornito dal kit. Preparare un bianco di estrazione per ogni serie di campioni in analisi (100 µL di lysis reagent ai quali non si aggiunge alcun brodo di prearricchimento).

Mescolare pipettando quindi chiudere il tubo o la piastra deep well con un film. Incubare in blocco riscaldante a 95-100°C alla velocità di 1300 rpm. Nel caso si utilizzino provette miscelare su Vortex ad alta velocità e centrifugare a 10-12000 giri per almeno 2 minuti.

## Estrazione del DNA

- Distribuire 100 µL di reagente di lisi A omogeneizzato nelle provette o pozzetti nelle piastre Deepwell.
- Prelevare 100 µL di campione decantato e arricchito.
- Miscelare la soluzione pipettando su e giù nella provetta e chiudere le provette con tappi o sigillare la Deepwell con la pellicola sigillante preforata.
- Incubare nel termoblocco appropriato a 95-100°C per 10-15 minuti o nell'agitatore incubatore per 15-20 minuti a 1.300 rpm.
- Miscelare le provette su Vortex a grande velocità (Se usate una piastra Deepwell lasciare raffreddare a temperatura ambiente).
- Centrifugare per almeno 2 minuti a 10.000-12.000 g le provette (la centrifugazione non è necessaria per le piastre Deepwell).

## PCR in Real-Time

Preparare una mix di PCR contenente la soluzione di amplificazione (reagent C) e la sonda fluorescente (reagent B). Per definire il corretto volume da usare sommare al numero di campioni anche i controlli da analizzare, quindi trovare i corrispondenti volumi di reagenti C e B indicati nell'appendice A del KIT. Il controllo positivo e il controllo negativo forniti dal kit vanno inclusi sempre in ogni reazione di PCR.

Ricordarsi di fare un bianco mix per ogni seduta di PCR.

Dopo la preparazione la mix di PCR (reagente B+C) deve essere immediatamente usata o deve essere conservata a 2-8° per non più di un'ora (tempo di max stabilità).

Pipettare 45µL della mix di PCR in ogni pozzetto in accordo con la distribuzione in piastra dei campioni e dei controlli. Aggiungere 5 µL di campione o di bianco o di reagente D (controllo negativo) o di reagente E (controllo positivo), evitando di creare bolle sul fondo del pozzetto, sigillare il pozzetto.

Collocare la piastra o le strip PCR nel termociclatore. Verificarne il corretto posizionamento (pozzetto A1 in alto a sinistra). Chiudere il modulo di reazione.

- 1° step 95°C 10 minuti
- 2° step 95°C 15 secondi
- 3° step 58°C 20 secondi
- 4° step 2°C 30 secondi

Il ciclo di amplificazione dallo step 2 allo step 4 va ripetuto per 49 cicli.

## Analisi dei dati e interpretazione dei risultati

Una volta impostati i parametri dell'analisi, i risultati possono essere interpretati leggendo i valori di Ct (ciclo a partire dal quale la fluorescenza si innalza in modo significativo a partire dal rumore di fondo).

Prima dell'interpretazione finale dei risultati è necessario verificare i risultati dei controlli negativi e positivi. Affinché il test sia valido, i risultati dei controlli negativi e positivi devono essere i seguenti. Se i risultati dei controlli positivi e negativi sono diversi da quelli descritti nella Tabella B1 qui di seguito, è necessario ripetere la reazione PCR.

**Tabella B1. Interpretazione dei controlli positivi e negativi**

Controllo	Rivelazione di <i>Salmonella</i> (FAM)	Rivelazione del Controllo Interno
Negativo	Ct = N/A*	28 ≤ Ct ≤ 40
Positivo	26 ≤ Ct ≤ 36	Non significativo

\* N/A = "Non Applicabile". Il software indica N/A per il Ct di un campione quando la curva di fluorescenza non si innalza in modo significativo al di sopra del rumore di fondo e pertanto non supera la soglia.

Un campione viene considerato positivo per la *Salmonella* se si ottiene un valore di  $Ct \geq 10$  per il fluoroforo FAM. Se si ottiene un valore inferiore a 10, verificare che la curva come dato grezzo mostri un aspetto caratteristico di amplificazione esponenziale (linea di base piatta, poi aumento regolare della fluorescenza, seguita da un appiattimento). Se la curva osservata è corretta, si può considerare il campione positivo per la presenza di *Salmonella*.

Se non viene ottenuto alcun valore per Ct FAM ( $Ct = N/A$ ) oppure se la curva osservata non è caratteristica, l'interpretazione del risultato dipende dal valore del controllo interno:

- Un campione è considerato negativo per la *Salmonella* se non viene ottenuto alcun valore di Ct per il fluoroforo FAM ( $Ct \text{ FAM} = N/A$ ) e il Ct per il controllo interno è superiore o uguale a 28.
- Un valore N/A per il Ct del controllo interno indica, quando il Ct in FAM è anch'esso N/A, che si è verificato probabilmente un fenomeno di inibizione della reazione di PCR. In questo caso, il campione di DNA deve essere diluito a 1/10 in acqua distillata sterile, poi sottoposto a nuova PCR. (cfr. parte VII.B. Estrazione degli acidi nucleici).
- Se il Ct per il controllo interno è inferiore a 28 non è possibile interpretare il risultato.

Verificare che la soglia sia stata correttamente posizionata o che la curva grezza mostri un aspetto caratteristico di amplificazione esponenziale. Se la curva osservata non è corretta, sarà necessario ripetere il test PCR per questo campione (Tabella B2).

**Tabella B2. Interpretazione dei risultati**

Rivelazione di <i>Salmonella</i> (FAM)	Rivelazione del controllo interno	Interpretazione
$Ct \geq 10$	Non significativo	Positivo
$Ct = N/A$	$Ct \geq 28$	Negativo
$Ct = N/A$	$Ct = N/A^*$	Inibizione

\* N/A = "Non Applicabile". Il software indica N/A per il Ct di un campione quando la curva di fluorescenza non si innalza in modo significativo al di sopra del rumore di fondo e pertanto non supera la soglia.



**APPENDICE C**  
**Metodi di identificazione di *E.coli* patogeni in campioni  
di origine animale, da alimenti e da ambiente**



Il metodo descritto è basato sul principio dell'amplificazione specifica di una sequenza di DNA per mezzo della reazione a catena della polimerasi (PCR) ed è destinato all'accertamento della presenza di geni di virulenza.

## Definizioni

Le sequenze genomiche codificanti fattori di virulenza prese in considerazione sono:

- geni codificanti enterotossine LT (termolabile) ed ST (termostabile); la loro produzione rappresenta il principale carattere di virulenza dei ceppi enterotossigeni (ETEC), grazie al quale provocano una diarrea di tipo secretivo. La LT e la ST provocano uno squilibrio del flusso di Cl<sup>-</sup> e NaCl e la secrezione di fluidi nel lume.
- *eae*, presente nei ceppi di *E.coli* enteropatogeni (EPEC) ed enteroemorragici (EHEC), e codificante l'intimina è una sequenza contenuta in un'isola di patogenicità LEE (Locus of Enterocytes Effacements) responsabile in vitro delle lesioni nell'enterocita di tipo "attaching and effacing".
- sequenza Agg, è costituita da un frammento di DNA contenuto in un plasmide in grado di conferire un fenotipo di adesione all'enterocita di tipo aggregativo ed è condivisa dai ceppi di *E.coli* enteroaggregativi (EAEC). Questi stipti aderiscono alle cellule e si presentano aggregati tra loro in una sorta di auto-agglutinazione mediata da fimbrie.
- famiglia dei geni VT; codificanti le Verocitotossine (VT). Le VT costituiscono una famiglia di tossine costituita da due tipi principali denominati VT1 e VT2, diversi per proprietà antigeniche e biologiche prodotte dai ceppi EHEC associati a quadri morbosi nell'uomo.
- *ipaH*, presente nei ceppi di *E.coli* EIEC.

## Modalità operative

I campioni vengono saggiati attraverso la metodica della PCR per la presenza dei geni di virulenza riportati in Tabella C1.

**Tabella C1. Geni di virulenza testati e condizioni di PCR per identificazione di *E.coli***

E.coli	Fattore virulenza	Primer		Condizioni PCR (30 cicli)			
		nome	sequenza	D	A	E	AS
ETEC	st	STI-1 <sup>(1)</sup>	5'-tta ata gca ccc ggt aca agc agg-3'	94°C	55°C	72°C	322
		STI-2 <sup>(1)</sup>	5'-ctt gac tct tca aaa gag aaa att ac-3'	50"	90"	2'	
ETEC	lt	LTb-1 <sup>(1)</sup>	5'-tct cta tgt gca tac gga gc-3'	94°C	55°C	72°C	147
		LTb-2 <sup>(1)</sup>	5'-cca tac tga ttg ccg caa t-3'	50"	90"	2'	
EPEC/ EHEC	eae	SK1 <sup>(2)</sup>	5'-ccc gaa ttc ggc aca agc ata agc-3'	94°C	52°C	72°C	800
		SK2 <sup>(2)</sup>	5'-ccc gga tcc gtc tgc cca gta ttc g-3'	30"	60"	60"	
VTEC	VT univ.	MK1 <sup>(3)</sup>	5'-ttt acg ata gac ttc tgc ac-3'	94°C	43°C	72°C	230
		MK2 <sup>(3)</sup>	5'-cac ata taa att att tgc ctc-3'	90"	3'	4'	
VTEC	VTI	KS7 <sup>(4)</sup>	5'-ccc gga tcc atg aaa aaa aca tta tta ata gc-3'	94°C	52°C	72°C	285
		KS8 <sup>(4)</sup>	5'-ccc gaa tcc agc tat tct gag tca acg-3'	30"	60"	40"	
VTEC	VTII	GK3 <sup>(4)</sup>	5'-ccc gga tcc atg aag aag atg ttt atg gcg-3'	94°C	52°C	72°C	260
		GK4 <sup>(4)</sup>	5'-ccc gaa ttc tca gtc att att aaa ctg cac-3'	30"	60"	40"	
EAEC	EAggEC probe	Agg-1 <sup>(5)</sup>	5'-caa tgt ata gaa atc cgc tgt t-3'	94°C	53°C	72°C	630
		Agg-2 <sup>(5)</sup>	5'-ctg gcg aaa gac tgt atc at-3'	30"	60"	50"	
EIEC	ipaH	Shig-1 <sup>(6)</sup>	5'-tgg aaa aac tca gtg cct ct-3'	94°C	55°C	72°C	423
		Shig-2 <sup>(6)</sup>	5'-cca gtc cgt aaa ttc att ct-3'	50"	90"	2'	

D: denaturation; A: annealing; E: extension; AS: amplificazione della sequenza del gene (bp)

## Protocollo estrazione DNA

- Prelevare 2 mL del brodo di arricchimento (acqua peptonata) contenente il campione da analizzare
  - Prelevare 1 mL della brodocoltura di arricchimento e trattare ad alte temperature (bollitura)
  - Centrifugare
  - Eliminare il sovrantante
  - Aggiungere H<sub>2</sub>O distillata sterile
  - Vortexare
  - Utilizzare il DNA dei campioni per la ricerca dei geni di virulenza
  - Conservare il brodo di arricchimento (acqua peptonata) rimasto
  - Se il campione è positivo anche ad un solo gene di virulenza seminare il brodo di arricchimento su Mac Conkey Agar
  - Dal pool rifare la PCR per il gene positivo
- Se confermato il positivo testare le singole colonie per il gene in modo da isolare il ceppo

## Allestimento delle reazioni di amplificazione

La ricerca della sequenze codificanti avviene sottoponendo ciascun campione alla reazioni di PCR con una coppia di *primer* aggiungendo il template di DNA gnomico nella miscela di reazione in un volume finale di 50 µL (Tabella C2).

**Tabella C2. Miscela di reazione del campione**

Reagenti	Concentrazione finale	Per 1 campione
Buffer 5X	1X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM	2,4 µL
dNTPs MIX (10mM)	0,2 mM	1 µL
upstream <i>primer</i> (30 µM)	1 µM	1 µL
downstream <i>primer</i> (30 µM)	1 µM	1 µL
Taq polimerasi (5U µL)	1 unità	0,2 µL
DNA		10 µL
Acqua distillata sterile	a volume	29,4 µL

## Preparazione gel di agarosio

agarosio in polvere	1,5%
tampone tris borato (5X)	1/10 volume finale

Aggiungere la polvere di agarosio all'acqua contenente il tampone e portare a volume. Sciogliere la polvere riscaldando la soluzione su una piastra riscaldante o in un forno a microonde finché diventi limpida. Lasciare raffreddare fino alla temperatura di circa 55°C, aggiungere il bromuro di etidio e colare nello stampo in cui è stato precedentemente inserito il pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento. Lasciare solidificare prima dell'uso.

## Interpretazione dei risultati

I campioni che presentano prodotti di amplificazione delle dimensioni attese dopo la reazione di amplificazione devono essere considerati come contenenti stipiti di *E.coli* potenzialmente patogeni.

Il requisito della presenza di analoghe bande nei controlli positivi e di assenza nei controlli negativi è considerato come caratteristica irrinunciabile per la corretta valutazione del risultato e deve per tanto essere sempre soddisfatto.



## Bibliografia

1. Olsvik O, Strockbine NA. PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Ed.). *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. Rochester, NY: Mayo Foundation; 1993. p. 271-6.
2. Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 1993;31:1201-5.
3. Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27:2751-7.
4. Russmann H, Kothe E, Schmidt H, *et al.* Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J Med Microbiol* 1995;42:404-10.
5. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995;33:7011-5.
6. Luscher D, Altwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. *Mol Cell Probes* 1994;8:285-90.



**APPENDICE D**  
**Indicatori per la valutazione della qualità del sistema  
di sorveglianza dei casi umani di infezione da *Salmonella* spp.**





Università degli Studi di Catanzaro  
"Magna Græcia"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Cattedra di Igiene  
Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva

## Indicatori di processo

Indicatore	Mappatura laboratori eleggibili per la sorveglianza delle salmonellosi
Significato	Intende misurare l'esaustività della potenziale rilevazione dei casi. Si è preferito, a differenza di altri sistemi di sorveglianza, non limitare la rilevazione ai soli laboratori ospedalieri, poiché c'è da aspettarsi che molti dei casi non siano ospedalizzati
Calcolo	$\frac{\text{N. laboratori di microbiologia pubblici e privati accreditati che effettuano la ricerca di } Salmonella \text{ da casi umani contattati per telefono per la richiesta di adesione}}{\text{N. laboratori di microbiologia, pubblici e privati accreditati che effettuano la ricerca di } Salmonella \text{ da casi umani censiti attraverso più fonti ufficiali}}$
Limiti	La mancanza di un'unica fonte per il reperimento dei laboratori accreditati (Regione, ASP, Distretti, ecc.) ha reso complesso l'accertamento dell'esaustività dei dati a nostra disposizione. Si è preferito, comunque, utilizzare tutte le fonti disponibili, privilegiando l'esaustività rispetto alla rapidità dell'esecuzione del censimento
Standard	100%
Indicatore	Adesione al sistema di sorveglianza
Significato	Intende misurare il livello di copertura della potenziale rilevazione di casi del sistema di sorveglianza. Una scarsa adesione dei laboratori periferici rende difficile la misura del grado di copertura anche perché non è possibile individuare il bacino utenza dei singoli laboratori
Calcolo	$\frac{\text{N. laboratori che partecipano alla rete di sorveglianza}}{\text{N. totale laboratori che effettuano ricerca di } Salmonella \text{ spp. su campioni umani}}$
Limiti	La semplice adesione dei laboratori, pur essendo condizione necessaria, non è sufficiente a garantire una esaustiva rilevazione dei casi che dipende dalle reali segnalazioni dai laboratori periferici al centro di riferimento
Standard	≥90%
Indicatore	Completezza della segnalazione dei casi confermati di <i>Salmonella</i> spp. da parte dei laboratori periferici
Significato	Intende misurare la capacità del sistema di sorveglianza di fornire informazioni non solo relative al campione biologico, ma anche a quelle necessarie per l'identificazione anagrafica dei casi
Calcolo	$\frac{\text{N. laboratori periferici che trasmettono il campione biologico, i dati anagrafici e il consenso all'esecuzione dell'intervista telefonica del paziente per il completamento dell'inchiesta epidemiologica}}{\text{N. totale laboratori periferici che hanno segnalato il caso confermato di } Salmonella \text{ spp.}}$
Limiti	L'identificazione dei soggetti non consente di per sé di caratterizzarli dal punto di vista epidemiologico
Standard	≥ 80%

<b>Indicatore</b>	<b>Tempestività della segnalazione dei casi confermati di <i>Salmonella</i> spp. da parte dei laboratori periferici al centro di riferimento</b>
Significato	Misura indirettamente la capacità del sistema di sorveglianza di raccogliere informazioni valide sulle caratteristiche epidemiologiche dei casi, in quanto un lasso di tempo troppo lungo tra la comparsa dei sintomi e l'esecuzione dell'intervista telefonica può ridurre l'attendibilità delle informazioni raccolte, in particolare sui fattori rischio
Calcolo	$\frac{\text{N. laboratori periferici che hanno segnalato il caso confermato al centro di riferimento entro 96 ore dall'isolamento}}{\text{N. totale laboratori periferici che hanno segnalato il caso confermato al centro di riferimento}}$
Limiti	È una condizione necessaria, ma non sufficiente per garantire la validità della raccolta delle informazioni epidemiologiche sui casi
Standard	≥ 90%
<b>Indicatore</b>	<b>Ospedalizzazione per infezione da <i>Salmonella</i> spp.</b>
Significato	Misura la capacità del sistema di sorveglianza di intercettare tutti i casi di salmonellosi e non solo di quelli più gravi, che richiedono l'ospedalizzazione
Calcolo	$\frac{\text{N. casi confermati provenienti da pazienti ospedalizzati}}{\text{N. totale casi confermati inviati dai laboratori afferenti alla rete di sorveglianza}}$
Limiti	Sebbene si ritenga che la maggioranza degli episodi di salmonellosi vengano trattati al di fuori delle strutture ospedaliere, non è possibile, non avendo dati precedenti relativi alla nostra regione, escludere che un'elevata o bassa ospedalizzazione dipenda dai comportamenti prescrittivi del personale sanitario e non dalle caratteristiche del sistema di sorveglianza
Standard	≤ 45%

## Indicatori di risultato

<b>Indicatore</b>	<b>Tasso di salmonellosi in Calabria rilevato attraverso il sistema di sorveglianza</b>
Significato	Misura la capacità del sistema di sorveglianza di rilevare esaustivamente i casi
Calcolo	$\frac{\text{N. isolamenti di } Salmonella \text{ spp. su campioni umani inviato dai laboratori afferenti alla rete di sorveglianza}}{\text{N. abitanti della Regione Calabria (dati ISTAT)}} \times 100.000$
Limiti	Il limite principale riguarda l'individuazione dello standard, in quanto non avendo dati di riferimento regionali ed essendo il tasso di salmonellosi comunque in fase di riduzione nel nostro Paese un tasso atteso alto potrebbe penalizzare ingiustificatamente la qualità del sistema, mentre un tasso basso potrebbe non rispecchiare la reale realtà epidemiologica della Regione
Standard 2012-2013	> 4,1 casi confermati/anno per 100.000
Standard 2013-2014	> 2,7 casi confermati/anno per 100.000

<b>Indicatore</b>	<b>Corrispondenza tra i casi confermati dai laboratori periferici e il laboratorio del centro di riferimento regionale</b>
Significato	Misura il grado di affidabilità degli isolamenti eseguiti nei laboratori periferici rispetto al laboratorio di riferimento
Calcolo	$\frac{\text{N. campioni confermati presso il laboratorio del centro di riferimento}}{\text{N. totale di casi confermati inviati dai laboratori afferenti alla rete di sorveglianza}}$
Limiti	Non consente di verificare l'eventuale mancato isolamento di casi da parte di esami colturali eseguiti nei laboratori periferici
Standard	≥ 95%
<b>Indicatore</b>	<b>Corrispondenza tra i casi confermati dal laboratorio del centro di riferimento regionale e l'ISS</b>
Significato	Misura il grado di affidabilità degli isolamenti eseguiti nel laboratorio di riferimento rispetto al laboratorio dell'ISS
Calcolo	$\frac{\text{N. campioni da casi umani rilevati nella Regione Calabria e confermati presso l'ISS}}{\text{N. campioni confermati dal laboratorio del centro di riferimento regionale}}$
Limiti	Non consente di verificare l'eventuale mancato isolamento di casi da parte di esami colturali eseguiti nel laboratorio di riferimento
Standard	≥ 95%
<b>Indicatore</b>	<b>Percentuale di inchieste epidemiologiche complete</b>
Significato	Intende misurare la capacità del sistema di sorveglianza di fornire informazioni non solo quantitative sui casi, ma anche di caratterizzarne il pattern epidemiologico in relazione alle caratteristiche dei soggetti coinvolti e agli eventuali fattori di rischio maggiormente riportati
Calcolo	$\frac{\text{N. interviste telefoniche complete}}{\text{N. totale casi confermati dal sistema di sorveglianza}}$
Limiti	Non consente di valutare il rischio legato ai diversi fattori coinvolti, in quanto le informazioni descrittive raccolte sono relative solo ai casi
Standard	>75%
<b>Indicatore</b>	<b>Monitoraggio dell'andamento delle segnalazioni</b>
Significato	Misura il miglioramento e consolidamento del sistema di sorveglianza, ci si attende che nel tempo il numero di segnalazioni tenda ad aumentare
Calcolo	$\frac{\text{N. campioni positivi isolati nel 2° anno} - \text{N. campioni positivi isolati nel 1° anno}}{\text{N. campioni positivi isolati nel 1° anno di attività del sistema di sorveglianza}}$
Limiti	Gli incrementi e/o riduzioni delle segnalazioni possono anche essere legati ad un aumento/riduzione dell'incidenza dei casi
Standard	Incremento nel I semestre del II anno del 25% rispetto al I semestre del I anno. Incremento nel II semestre del II anno del 50% rispetto al II semestre del I anno.





**APPENDICE E**  
**Scheda di accompagnamento del campione**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANZARO  
"MAGNA GRÆCIA"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Cattedra di Igiene  
Scuola di Specializzazione  
in Igiene e Medicina Preventiva

---

Sorveglianza Salmonellosi • Unità di Ricerca Calabria

---

## SCHEDA DI ACCOMPAGNAMENTO DEL CAMPIONE

### A) INFORMAZIONI ANAGRAFICHE DEL PAZIENTE

Nome e Cognome \_\_\_\_\_

Data di nascita \_\_\_\_\_ Luogo di nascita \_\_\_\_\_

Se il paziente è minore di 18 anni specificare nome e cognome di un genitore \_\_\_\_\_

Indirizzo \_\_\_\_\_ Città \_\_\_\_\_

Telefono/Cellulare (del paziente o del genitore in caso di minore di 18 anni) \_\_\_\_\_

Medico curante o Pediatra di libera scelta (spec. nome e cognome) \_\_\_\_\_

---

### B) DATI RELATIVI AL CAMPIONE

Laboratorio (spec.) \_\_\_\_\_

Comune laboratorio \_\_\_\_\_ Provincia \_\_\_\_\_

N. Campione \_\_\_\_\_ Data del prelievo \_\_\_\_\_

Tipo di campione \_\_\_\_\_  tampone rettale  feci

Motivo dell'esame \_\_\_\_\_

**Grazie per la preziosa collaborazione**



**APPENDICE F**  
**Scheda di rilevazione**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANZARO  
"MAGNA GRÆCIA"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Cattedra di Igiene  
Scuola di Specializzazione  
in Igiene e Medicina Preventiva

**Sorveglianza Salmonellosi • Unità di Ricerca Calabria**

**SCHEDA DI RILEVAZIONE**

N. PROT. \_\_\_\_\_ Data compilazione \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(uguale a quella del relativo microrganismo)

**A. Dati relativi al paziente**

- A.1** Nome e Cognome \_\_\_\_\_
- A.2** Sesso  Maschio  Femmina
- A.3** Data di nascita \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ **A.4** Luogo di nascita \_\_\_\_\_
- A.5** Comune di residenza \_\_\_\_\_ **A.6** Provincia di residenza \_\_\_\_\_
- A.7** Stato civile  Nubile/celibe  Coniugato/a  Altro
- A.8** Titolo di studio  Nessuno  Elementare  Medio inferiore  
 Medio superiore  Diploma di Laurea
- A.9** Attività lavorativa \_\_\_\_\_

**B Sintomatologia e decorso clinico**

- B.1** Prima di eseguire l'esame colturale delle feci ha avuto manifestazioni cliniche?  
 no (vai alla domanda B.5)  sì
- B.2** Quando sono comparsi i sintomi? \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_
- B.3** Qual è stata la durata dei sintomi? (specificare il numero di giorni/ore) \_\_\_\_\_
- B.4** Quali sintomi ha presentato? (segnare anche più risposte)
- |                    | no                       | sì  |
|--------------------|--------------------------|---|
| Febbre             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Crampi addominali  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Vomito             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> (quante volte?) _____    |
| Diarrea            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> (quante scariche?) _____ |
| Astenia/stanchezza | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Dolori articolari  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Cefalea            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Ittero             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Urine ipercromiche | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
| Sangue nelle feci  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>                          |
- B.5** Specificare il motivo per cui ha eseguito l'esame colturale delle feci \_\_\_\_\_
- B.6** Si è rivolto/a ad un medico prima di eseguire l'esame colturale delle feci e/o della comparsa dei sintomi?  
 no (vai alla domanda B.8)  sì

- B.7** A quale medico si è rivolto/a?  Medico di medicina generale  Medico specialista privato  
 Guardia medica  Ospedale/Pronto Soccorso
- B.8** È stato/a ricoverato/a nei giorni immediatamente precedenti o successivi all'esecuzione dell'esame colturale delle feci?  
 no (vai alla domanda B.12)  sì
- B.9** In quale reparto è stato/a ricoverato/a? \_\_\_\_\_
- B.10** Quant'è durato il ricovero? \_\_\_\_\_
- B.11** Qual è stata la diagnosi della dimissione? (spec.) \_\_\_\_\_
- B.12** A causa dei sintomi presentati o nei giorni immediatamente precedenti o successivi all'esecuzione dell'esame colturale delle feci, ha assunto farmaci?  
 no (vai alla domanda B.17)  sì
- B.13** Quali farmaci ha assunto? \_\_\_\_\_
- B.14** Ha eseguito antibiotico-terapia?  no (vai alla domanda B.17)  sì
- B.15** Quale antibiotico ha utilizzato? \_\_\_\_\_
- B.16** Per quanti giorni? \_\_\_\_\_
- B.17** Oltre all'esame colturale delle feci ha eseguito altri esami di laboratorio?  
 no (vai alla domanda B.18)  sì  
 sì (spec. quali) \_\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_
- B.18** Quanti esami colturali delle feci ha eseguito? \_\_\_\_\_  
 Data \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_  
 Data \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_  
 Data \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_
- B.19** Qualcuno della sua famiglia ha avuto sintomi quali ad esempio febbre, vomito, diarrea?  
 no (vai alla domanda B.21)  sì (spec. numero) \_\_\_\_\_
- B.20** Ha eseguito l'esame colturale delle feci?  
 no  
 sì (spec. numero) \_\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_
- B.21** Qualcuno tra i suoi conoscenti ha avuto sintomi quali ad esempio febbre, vomito, diarrea?  
 no  sì (spec. numero) \_\_\_\_\_
- B.22** Ha avuto esperienze comuni con queste persone?  
 no  sì (indicarne anche più di una)  
 viaggio  convegno  
 cena  altro \_\_\_\_\_
- B.23** Ha effettuato un viaggio nelle due settimane precedenti l'esordio della sintomatologia e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci?  
 no (vai alla domanda C.1)  sì dal \_\_/\_\_/\_\_\_\_ al \_\_/\_\_/\_\_\_\_
- B.24** Luogo del viaggio:  
 Italia (spec.) \_\_\_\_\_  
 Estero (spec.) \_\_\_\_\_

### C Anamnesi alimentare

- C.1** Quale dei seguenti alimenti ha consumato nelle 48/72 ore precedenti l'insorgenza dei sintomi e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci? (indicarne anche più di uno)
- |           |   |                             |   |                                |                             |                             |
|-----------|---|-----------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Carne     | <input type="checkbox"/> cruda                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotta | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Salsiccia | <input type="checkbox"/> cruda                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotta | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Salumi    |   | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì (spec.) _____ |                                |                             |                             |
| Pesce     | <input type="checkbox"/> crudo                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotto | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Uova      | <input type="checkbox"/> crude (majonese, zabaione, tiramisù) | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotte | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Verdure   | <input type="checkbox"/> crude                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotte | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |



Latte/latticini  no  sì  
 Altro (spec.) \_\_\_\_\_

- C.2** Qual è la provenienza degli alimenti di cui abbiamo appena parlato?  
 supermercato  negozi (alimentari, fruttivendolo, macellaio)  
 produttori privati (allevatori, contadini)  produzione propria
- C.3** Ricorda dove ha consumato i pasti nelle 24/72 ore precedenti la comparsa dei sintomi e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci?  
 Domicilio  no  sì  
 Ristoranti  no  sì  
 Scuola  no  sì  non applicabile  
 Mensa  no  sì  non applicabile  
 Altro (spec.) \_\_\_\_\_

#### D Altre possibili fonti di contagio

- D.1** Possiede animali domestici?  no (vai alla domanda D.3)  sì
- D.2** Quali animali possiede? (dopo aver risposto vai alla D.3.2)  
 cani  gatti  
 volatili  altro \_\_\_\_\_
- D.3** Nelle due settimane precedenti la comparsa dei sintomi:
- D.3.1 Ha avuto contatti con animali domestici  no  sì  
 (es. cani, gatti, volatili)
- D.3.2 Ha avuto contatti con animali da allevamento  no  sì  
 (es. bovini, ovini, suini)
- D.3.3 Ha avuto contatti con animali selvatici  no  sì
- D.3.4 Ha partecipato a pranzi all'aperto  no  sì
- È stato in campeggio  no  sì
- D.3.5 Ha praticato nuoto o altri sport acquatici (sci, rafting, pesca)  no (vai alla domanda D.4)  sì
- Se ha risposto Sì:  
 vi erano animali/uccelli selvatici in prossimità del luogo in cui nuotava o faceva sport?  
 no  sì (spec.) \_\_\_\_\_
- D.4** Possiede un orto/giardino?  no  sì

#### E Contatti con acqua di sorgente o falde acquifere

- E.1** Utilizza acqua dei pozzi per:
- Bere  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_  
 Cucinare  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_
- E.2** Utilizza acqua di sorgente per:
- Bere  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_  
 Cucinare  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_
- E.3** Utilizza acqua di fontane pubbliche per:
- Bere  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_  
 Cucinare  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_

L'intervista è terminata. La ringrazio per la preziosa collaborazione e per il tempo che ci ha dedicato.



**APPENDICE G**  
**Scheda di rilevazione (<18 anni)**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANZARO  
"MAGNA GRÆCIA"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Cattedra di Igiene  
Scuola di Specializzazione  
in Igiene e Medicina Preventiva

Sorveglianza Salmonellosi • Unità di Ricerca Calabria

**SCHEDA DI RILEVAZIONE • PAZIENTI MINORI DI 18 ANNI**

N. PROT. \_\_\_\_\_  
(uguale a quella del relativo microrganismo)

Data compilazione \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Rispondente:

Madre

Padre

Altro (spec.)

Cognome e nome \_\_\_\_\_

**A. Dati relativi al paziente**

**A.1** Nome e Cognome \_\_\_\_\_

**A.2** Sesso  Maschio  Femmina

**A.3** Data di nascita \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**A.4** Luogo di nascita \_\_\_\_\_

**A.5** Comune di residenza \_\_\_\_\_

**A.6** Provincia di residenza \_\_\_\_\_

**A.7** Scuola  Asilo

Elementare

Media inferiore

Media superiore

**B Sintomatologia e decorso clinico**

**B.1** Prima di eseguire l'esame colturale delle feci ha avuto manifestazioni cliniche?

no (vai alla domanda B.5)  sì

**B.2** Quando sono comparsi i sintomi? \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**B.3** Qual è stata la durata dei sintomi? (specificare il numero di giorni/ore) \_\_\_\_\_

**B.4** Quali sintomi ha presentato? (segnare anche più risposte)

	no	sì
Febbre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crampi addominali	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vomito	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (quante volte?) _____
Diarrea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (quante scariche?) _____
Astenia/stanchezza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dolori articolari	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cefalea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ittero	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Urine ipercromiche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sangue nelle feci	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**B.5** Specificare il motivo per cui ha eseguito l'esame colturale delle feci \_\_\_\_\_

**B.6** Si è rivolto/a ad un medico prima di eseguire l'esame colturale delle feci e/o della comparsa dei sintomi?

no (vai alla domanda B.8)

sì

- B.7** A quale medico si è rivolto/a?  Medico di medicina generale  Medico specialista privato  
 Guardia medica  Ospedale/Pronto Soccorso
- B.8** È stato/a ricoverato/a nei giorni immediatamente precedenti o successivi all'esecuzione dell'esame colturale delle feci?  
 no (vai alla domanda B.12)  sì
- B.9** In quale reparto è stato/a ricoverato/a? \_\_\_\_\_
- B.10** Quant'è durato il ricovero? \_\_\_\_\_
- B.11** Qual è stata la diagnosi della dimissione? (spec.) \_\_\_\_\_
- B.12** A causa dei sintomi presentati o nei giorni immediatamente precedenti o successivi all'esecuzione dell'esame colturale delle feci, ha assunto farmaci?  
 no (vai alla domanda B.17)  sì
- B.13** Quali farmaci ha assunto? \_\_\_\_\_
- B.14** Ha eseguito antibiotico-terapia?  no (vai alla domanda B.17)  sì
- B.15** Quale antibiotico ha utilizzato? \_\_\_\_\_
- B.16** Per quanti giorni? \_\_\_\_\_
- B.17** Oltre all'esame colturale delle feci ha eseguito altri esami di laboratorio?  
 no (vai alla domanda B.18)  sì  
 sì (spec. quali) \_\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_
- B.18** Quanti esami colturali delle feci ha eseguito? \_\_\_\_\_  
 Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_  
 Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_  
 Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_
- B.19** Qualcuno della sua famiglia ha avuto sintomi quali ad esempio febbre, vomito, diarrea?  
 no (vai alla domanda B.21)  sì (spec. numero) \_\_\_\_\_
- B.20** Ha eseguito l'esame colturale delle feci?  
 no  
 sì (spec. numero) \_\_\_\_\_ Risultato \_\_\_\_\_
- B.21** Qualcuno tra i suoi conoscenti ha avuto sintomi quali ad esempio febbre, vomito, diarrea?  
 no  sì (spec. numero) \_\_\_\_\_
- B.22** Ha avuto esperienze comuni con queste persone?  
 no  sì (indicarne anche più di una)  
 viaggio  convegno  
 cena  altro \_\_\_\_\_
- B.23** Ha effettuato un viaggio nelle due settimane precedenti l'esordio della sintomatologia e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci?  
 no (vai alla domanda C.1)  sì dal \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ al \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- B.24** Luogo del viaggio:  
 Italia (spec.) \_\_\_\_\_  
 Estero (spec.) \_\_\_\_\_

### C Anamnesi alimentare

- C.1** Quale dei seguenti alimenti ha consumato nelle 48/72 ore precedenti l'insorgenza dei sintomi e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci? (indicarne anche più di uno)
- |           |   |                             |   |                                |                             |                             |
|-----------|---|-----------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Carne     | <input type="checkbox"/> cruda                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotta | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Salsiccia | <input type="checkbox"/> cruda                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotta | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Salumi    |   | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì (spec.) _____ |                                |                             |                             |
| Pesce     | <input type="checkbox"/> crudo                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotto | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Uova      | <input type="checkbox"/> crude (majonese, zabaione, tiramisù) | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotte | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |
| Verdure   | <input type="checkbox"/> crude                                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì               | <input type="checkbox"/> cotte | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> sì |

- Latte/latticini  no  sì  
 Altro (spec.) \_\_\_\_\_
- C.2** Qual è la provenienza degli alimenti di cui abbiamo appena parlato?  
 supermercato  negozi (alimentari, fruttivendolo, macellaio)  
 produttori privati (allevatori, contadini)  produzione propria
- C.3** Ricorda dove ha consumato i pasti nelle 24/72 ore precedenti la comparsa dei sintomi e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci?  
 Domicilio  no  sì  
 Ristoranti  no  sì  
 Scuola  no  sì  non applicabile  
 Mensa  no  sì  non applicabile  
 Altro (spec.) \_\_\_\_\_

#### D Altre possibili fonti di contagio

- D.1** Possiede animali domestici?  no (vai alla domanda D.3)  sì
- D.2** Quali animali possiede? (dopo aver risposto vai alla D.3.2)  
 cani  gatti  
 volatili  altro \_\_\_\_\_
- D.3** Nelle due settimane precedenti la comparsa dei sintomi:
- D.3.1 Ha avuto contatti con animali domestici  no  sì  
 (es. cani, gatti, volatili)
- D.3.2 Ha avuto contatti con animali da allevamento  no  sì  
 (es. bovini, ovini, suini)
- D.3.3 Ha avuto contatti con animali selvatici  no  sì
- D.3.4 Ha partecipato a pranzi all'aperto  no  sì
- È stato in campeggio  no  sì
- D.3.5 Ha praticato nuoto o altri sport acquatici (sci, rafting, pesca)  no (vai alla domanda D.4)  sì
- Se ha risposto Sì:  
 vi erano animali/uccelli selvatici in prossimità del luogo in cui nuotava o faceva sport?  
 no  sì (spec.) \_\_\_\_\_
- D.4** Possiede un orto/giardino?  no  sì

#### E Contatti con acqua di sorgente o falde acquifere

- E.1** Utilizza acqua dei pozzi per:
- Bere  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_  
 Cucinare  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_
- E.2** Utilizza acqua di sorgente per:
- Bere  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_  
 Cucinare  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_
- E.3** Utilizza acqua di fontane pubbliche per:
- Bere  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_  
 Cucinare  no  sì (spec. dove) \_\_\_\_\_

L'intervista è terminata. La ringrazio per la preziosa collaborazione e per il tempo che ci ha dedicato.





**APPENDICE H**  
**Informativa per il paziente**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANZARO  
"MAGNA GRÆCIA"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Cattedra di Igiene  
Scuola di Specializzazione  
in Igiene e Medicina Preventiva

**Modulo1**

**TITOLO DELLO STUDIO EPIDEMIOLOGICO:**

**Sorveglianza epidemiologica sui casi umani di *Salmonella* spp. nella Regione Calabria**

**INFORMATIVA PER IL PAZIENTE**

*(Questo modulo riporta le informazioni essenziali sullo studio epidemiologico per il quale Le viene chiesta l'autorizzazione)*

**Disegno dello studio**

L'indagine, condotta dalla Cattedra di Igiene della Scuola di Medicina e Chirurgia dell'Università "Magna Græcia", si propone di valutare l'incidenza delle salmonellosi nella Regione Calabria, la definizione dei sierotipi maggiormente diffusi nel nostro territorio e l'identificazione del profilo di antibiotico-resistenza al fine di quantificare e caratterizzare il fenomeno della multi-antibiotico resistenza.

Verranno, pertanto, coinvolti tutti coloro che avranno effettuato, in un laboratorio che ha dato l'adesione a partecipare allo studio, un esame colturale delle feci risultato positivo per *Salmonella* spp.; ai pazienti di età  $\geq$  ai 18 anni, o ai genitori nel caso di  $<$  18 anni, verrà somministrato un questionario telefonico entro 10 giorni dal ricevimento della piastra su cui è stato isolato il patogeno.

Saranno raccolte informazioni relative ai dati anagrafici e socio-economici del paziente (età, stato civile, titolo di studio e attività lavorativa), informazioni sulla sintomatologia, il decorso clinico, l'eventuale ricovero (reparto di degenza, diagnosi di dimissione), sull'assunzione di farmaci e in particolare antibiotici, sull'esecuzione dell'esame colturale delle feci e infine sui luoghi visitati e il cibo consumato nelle 24/72 ore precedenti l'insorgenza dei sintomi e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci.

La partecipazione allo studio è totalmente libera, inoltre, i pazienti che firmano il consenso, possono ritirarlo in qualsiasi momento.

Ai sensi del decreto legislativo 196/2003 (Codice in materia di protezione dei dati personali), il trattamento, l'analisi e l'archiviazione dei dati sarà effettuata in forma aggregata e non comporterà alcuna diffusione nominativa. Sono state prese tutte le precauzioni necessarie affinché attraverso le informazioni contenute nel questionario non sia possibile risalire a chi lo ha compilato, sarà quindi completamente mantenuto l'anonimato.

**Modulo2**

**TITOLO DELLO STUDIO EPIDEMIOLOGICO:**

**Sorveglianza epidemiologica sui casi umani di *Salmonella* spp. nella Regione Calabria**

**CONSENSO INFORMATO ALLA PARTECIPAZIONE ALLO STUDIO**

*(Questo modulo deve essere firmato solo nel caso decida di partecipare allo studio epidemiologico)*

Io sottoscritto/a \_\_\_\_\_

nato/a a \_\_\_\_\_ il \_\_\_\_\_

Recapito telefonico abitazione \_\_\_\_\_ e/o cellulare \_\_\_\_\_

In caso di minore di 18 anni:

Genitore di: Nome \_\_\_\_\_ Cognome \_\_\_\_\_

Nato/a a \_\_\_\_\_ il \_\_\_\_\_

**DICHIARO**

- di essere stato/a esaurientemente informato/a a proposito dello studio epidemiologico in oggetto;
- di aver ricevuto una copia della scheda informativa da conservare;
- di averne discusso adeguatamente con i Medici responsabili dello studio e/o i referenti del laboratorio;

**PERTANTO**

rilascio il mio consenso libero e informato a prendere parte allo studio in oggetto;  
autorizzo i medici della Scuola di Medicina e Chirurgia dell'Università di Catanzaro a contattarmi telefonicamente al fine di acquisire informazioni relative a terapie effettuate, cibi consumati e luoghi frequentati nelle 48/72 ore precedenti l'insorgenza dei sintomi e/o l'esecuzione dell'esame colturale delle feci;

autorizzo per gli scopi di questo studio il trattamento dei dati in formato cartaceo ed elettronico, nel rispetto della normativa vigente, ai sensi del decreto legislativo 196/2003.

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

*Firma leggibile di chi esprime il consenso*

*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di ottobre 2015, 2° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, ottobre 2015*