

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Pericoli microbiologici emergenti
nell'alimentazione del neonato:
il caso *Enterobacter sakazakii***

Alfonsina Fiore, Maria Casale, Paolo Aureli

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

04/13

Istituto Superiore di Sanità

Pericoli microbiologici emergenti nell'alimentazione del neonato: il caso *Enterobacter sakazakii*.

Alfonsina Fiore, Maria Casale, Paolo Aureli

2004, 35 p. Rapporti ISTISAN 04/13

Enterobacter sakazakii è un microrganismo patogeno opportunisto che, di recente, si è reso responsabile di gravi patologie, quali meningiti, batteriemie, enterocoliti necrotizzanti, anche ad esito letale, nei neonati, in particolare quelli sottoposti a terapia intensiva (bambini pre-termine, a basso peso o immunocompromessi). Il principale veicolo della sua trasmissione fino ad oggi riconosciuto è il latte in polvere per l'infanzia. Le infezioni che tale microrganismo provoca possono presentarsi in forma sporadica o come eventi a carattere epidemico. L'aumento del numero delle segnalazioni registrate negli ultimi anni ha suscitato il crescente interesse della comunità scientifica e ha portato all'approfondimento e allo studio della tassonomia, dell'ecologia, del potere patogeno, dei fattori di virulenza, dei fattori di sensibilità degli ospiti e di appropriate misure per la prevenzione e il controllo.

Parole chiave: *Enterobacter sakazakii*, Latte formulato in polvere per l'infanzia, Neonati, Prevenzione, Controllo

Istituto Superiore di Sanità

Emergent microbiologic hazards in infant feeding: *Enterobacter sakazakii* case.

Alfonsina Fiore, Maria Casale, Paolo Aureli

2004, 35 p. Rapporti ISTISAN 04/13 (in Italian)

Enterobacter sakazakii is an opportunist pathogen that has recently caused infection diseases such as meningitis, bacteremia and necrotizing enterocolitis, lethal too, in neonates, particularly infants in intensive care (pre-term, low birth and immunocomprised children). Infant milk formula is the main transmission source of *Enterobacter sakazakii*. *Enterobacter sakazakii* infections are sporadic or outbreaks cases. In the last years, infections increase has excited scientists' interest, and it has promoted the investigation of ecology, taxonomy, pathogenicity, determinants of virulence, host susceptibility factors, control measures and prevention.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, Infant milk formula, Infants, Prevention, Control measures

Per informazioni su questo documento scrivere a: p.aureli@iss.it; alfonsina.fiore@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

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

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2004

INDICE

Introduzione	1
Caratterizzazione dei microrganismi patogeni	3
<i>Enterobacter sakazakii</i>: caratteristiche generali	4
Caratteri biochimici	5
Habitat	6
Fattori di virulenza.....	6
Resistenza al calore e a condizioni ambientali sfavorevoli.....	6
Tempi di duplicazione	7
Sensibilità agli antibiotici	8
Sensibilità ad altri agenti.....	9
Dose infettante.....	9
Epidemiologia.....	9
<i>Enterobacter sakazakii</i>: patologie, trasmissione e identificazione	13
Manifestazioni cliniche.....	13
Popolazione a rischio	14
Veicolo alimentare.....	14
Criteri microbiologici di conformità	16
Metodi di analisi raccomandati.....	17
Conclusioni e raccomandazioni	19
Bibliografia	21
Appendice	
Metodi di analisi raccomandati.....	25
Allegato 1 – Ricerca di <i>Ent. sakazakii</i> in campioni ambientali.....	29
Allegato 2 – Metodo ISO	30
Allegato 3 – Metodo FDA.....	31
Allegato 4 – PFGE	32
Allegato 5 – RAPD-PCR	33
Allegato 6 – Ribotipizzazione	34
Allegato 7 – Metodo BAX	35

INTRODUZIONE

Incentivare il ritorno all'allattamento al seno è diventato negli ultimi anni una delle priorità di sanità pubblica nei Paesi industrializzati; così un numero crescente di pediatri raccomanda alle mamme di allattare esclusivamente al seno i propri figli nei primi mesi di vita in modo da assicurare loro ottimali condizioni di crescita, sviluppo e salute. In Italia, il Ministero della Salute ha emanato una circolare per la tutela e la promozione dell'allattamento al seno (Circolare n. 16 del 24 ottobre 2000) e la Società Italiana di Neonatologia raccomanda l'uso esclusivo del latte materno fino a circa il sesto mese di vita. Dopo tale periodo, però, i neonati, hanno bisogno di ricevere, oltre al latte materno, anche prodotti alimentari complementari, sicuri dal punto di vista igienico e adeguati sotto il profilo nutritivo, per soddisfare le crescenti esigenze nutrizionali. Il bambino, comunque, può continuare a ricevere il latte materno fino al secondo anno di vita.

Esistono, tuttavia, situazioni tali da non permettere il ricorso all'allattamento al seno – soggetti nati pre-termine, nati sottopeso (< 2 kg), immunocompromessi e HIV positivi –; in questi casi, è necessaria un'appropriata alimentazione di sostituzione costituita da latte formulato (liquido e in polvere), preparato secondo standard riconosciuti in campo internazionale.

L'uso del latte in polvere, però, richiede adeguate conoscenze sulle corrette modalità di preparazione e sui rischi igienici che possono derivare da manipolazione e conservazione impropri, sia a livello domestico che ospedaliero. Infatti, diversamente dal latte formulato liquido, che risulta “sterile” per effetto dei trattamenti tecnologici subiti prima della commercializzazione, le formulazioni in polvere hanno una flora microbica residua, composta generalmente da germi saprofiti e da coliformi (o più in generale, da *Enterobacteriaceae*, batteri considerati non patogeni o patogeni opportunisti).

Negli ultimi anni sono stati segnalati sempre più spesso casi di malattia, a carattere invasivo, associati ad enterobatteriacee quali *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri (diversus)*, *Citrobacter freundii*, in neonati e lattanti. Le prime indagini microbiologiche ed epidemiologiche, svolte per identificare la sorgente dell'infezione, non hanno purtroppo preso in considerazione la possibilità che essa potesse essere di origine alimentare; in altri casi, pur non essendo stato stabilito un legame tra la malattia e i suddetti microrganismi nel latte in polvere, tale legame è stato considerato possibile.

Il latte in polvere, inoltre, non è mai stato chiaramente identificato come il veicolo o la fonte dell'infezione nei casi sporadici di salmonellosi diversamente dagli eventi a carattere epidemico; questo dato può essere imputabile alla maggiore difficoltà che si incontra nell'identificare i veicoli dell'infezione nei casi sporadici e, pertanto non è da escludere una loro associazione con il consumo di latte in polvere.

Per la verità, la contaminazione da salmonella del latte in polvere è una eventualità piuttosto rara e, quando si verifica, si caratterizza per la bassa carica del patogeno infettante.

Casi di salmonellosi associati al latte in polvere sono stati segnalati per la prima volta agli inizi degli anni '50 nel Regno Unito e in Bulgaria (Marth, 1969). Le indagini epidemiologiche hanno permesso di dimostrare che le cause principali della contaminazione erano associate a carenze igieniche e/o a difetti di natura meccanica degli impianti (microforature, saldature rotte o piccole crepe). Da allora, sono stati segnalati vari episodi di salmonellosi neonatale epidemiologicamente e microbiologicamente associati alla contaminazione del latte in polvere (Park *et al.*, 2004; Bornemann *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2002; Threlfall *et al.*, 1998; Forsyth *et al.*, 2003; Usera *et al.*, 1996; CDC, 1993; Rowe *et al.*, 1987). Sin dai primi momenti, però, la

dimostrazione della contaminazione del latte formulato con la Salmonella si è rivelata un'impresa piuttosto complessa verosimilmente per i bassi livelli di contaminazione dei prodotti. A questo proposito, appare emblematica un'indagine condotta a seguito di un episodio di salmonellosi (Rowe *et al.*, 1987) in occasione del quale solo 4 dei 267 campioni di latte esaminati sono risultati contaminati e la concentrazione della carica infettante era verosimilmente pari a 1,6 microrganismi/450 g di prodotto.

Altri microrganismi, riscontrati di recente in casi di malattia associati al consumo di latte in polvere, hanno però riaperto la discussione sull'opportunità di rivedere le norme igieniche di produzione di tale prodotto e di integrare i criteri in uso con altri che considerassero i patogeni emergenti.

Del tutto recentemente, infatti, è stato segnalato un caso di botulismo infantile da *Clostridium botulinum* tipo B in un neonato di 5 mesi (CDSC, 2001). Le indagini di laboratorio hanno permesso di isolare lo stesso sierotipo sia dai reperti biologici del paziente che da una confezione di latte in polvere in uso e da quella integra prelevata presso la ditta produttrice. Allo stato attuale, però, non è ancora stato stabilito se i ceppi siano identici, e quindi se effettivamente sia stato il latte la causa dell'infezione perché non sono ancora stati confrontati i rispettivi profili molecolari.

I clostridi, per la verità, non sono mai stati considerati un problema igienico nei lattini in polvere, ma il fatto che la temperatura di processo utilizzata per la loro produzione non è adatta ad inattivare le spore, ha fatto ipotizzare l'opportunità di rivedere le norme igieniche di produzione e di introdurre misure appropriate per il loro controllo.

Un'altra infezione dei neonati, associata al consumo di latte in polvere contaminato e causata dall'*Enterobacter sakazakii*, sta attirando l'attenzione delle autorità sanitarie e di organismi sanitari internazionali data la gravità delle complicanze neurologiche che ne derivano e l'esito fatale che spesso la caratterizzano. Anche in questo caso il *Codex Commitee on Food Hygiene* della FAO/WHO, sta valutando l'opportunità di revisionare le *Recommended International Code of Hygienic Practices for Food for Infant and Children*, e di svolgere un profilo di rischio per tale patogeno nei lattini formulati in polvere. Per questo scopo sono stati avviati diversi studi sull'*Ent. sakazakii* al fine di ampliare le conoscenze sull'ecologia, la tassonomia, il potere patogeno, i fattori di virulenza, la popolazione a rischio, i veicoli di trasmissione, la dose infettante, i fattori che rendono suscettibili gli ospiti e il meccanismo molecolare di patogenesi. È, invece, ben riconosciuta la sua capacità di causare gravi malattie, quali, meningiti e enterocoliti necrotizzanti, un po' in tutto il mondo. Proprio per questa ragione l'*International Commission for Microbiological Specification for Foods* (ICMSF, 2002) ha definito l'*Ent. sakazakii* un "grave pericolo per una ristretta fascia di popolazione, con effetti cronici anche di lunga durata, capace di costituire una minaccia per la vita". Di conseguenza è stato inserito tra i patogeni alimentari più comuni come *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tipo A e *Cryptosporidium parvum* (Iversen e Forsythe, 2003).

La fascia di popolazione maggiormente colpita è rappresentata dai neonati, in particolare quelli sottoposti a terapia intensiva e alimentati con latte in polvere. Infatti, sembra essere proprio questo alimento il principale responsabile della trasmissione dell'agente infettivo, anche se non mancano casi di malattia tra gli adulti e i ragazzi.

CARATTERIZZAZIONE DEI MICRORGANISMI PATOGENI

Vari microrganismi patogeni possono essere veicolati dal latte formulato in polvere destinato all'alimentazione del neonato; in base all'associazione causale tra la presenza nel latte in polvere e la malattia del neonato, i microrganismi patogeni possono essere suddivisi in tre distinte categorie (Joint FAO/WHO, 2004):

- *Categoria A*
Appartengono a questa categoria la *Salmonella enterica* e l'*Ent. sakazakii*, microrganismi che causano severe patologie (infezioni sistemiche, enterocoliti necrotizzanti, diarree severe) nei soggetti alimentati con latte in polvere contaminato, per i quali è stata dimostrata microbiologicamente ed epidemiologicamente una chiara associazione tra presenza nel prodotto (veicolo e fonte dell'infezione) e insorgenza della malattia.
- *Categoria B*
Appartengono a questa categoria altre specie di *Enterobacteriaceae* che sono capaci di causare severe patologie (infezioni sistemiche, enterocoliti necrotizzanti, diarree severe) nei neonati e che sono state isolate nel latte in polvere per l'infanzia ma per le quali non esistono chiare evidenze epidemiologiche e microbiologiche che dimostrino la correlazione tra il prodotto contaminato e l'infezione nei neonati.
- *Categoria C*
Appartengono a questa categoria microrganismi quali, *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, che sebbene capaci di provocare gravi malattie nei neonati, non sono stati isolati dal latte in polvere per l'infanzia o, quando ciò è avvenuto, non sono stati riconosciuti come gli agenti responsabili.

Data la crescente preoccupazione che l'*Ent. sakazakii* sta suscitando presso le autorità sanitarie e i produttori di alimenti per l'infanzia, questa monografia descrive tutti gli aspetti che possono essere d'interesse per i neonatologi, le direzioni sanitarie, i responsabili dei laboratori di analisi ospedalieri, le autorità di controllo e le aziende produttrici di alimenti per l'infanzia, nell'intento di contribuire alla diffusione della sua conoscenza e facilitare l'adozione di corrette strategie per controllare il rischio di infezione nella popolazione più sensibile, i neonati.

ENTEROBACTER SAKAZAKII: CARATTERISTICHE GENERALI

È un bacillo gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, genere *Enterobacter*; è anaerobio facoltativo, asporigeno, mesofilo, mobile per flagelli peritrichi, catalasi-positivo e ossidasi-negativo (Abbott, 1999).

Cresce sui comuni terreni di coltura utilizzati per l'isolamento dei batteri enterici (MacConkey, eosina blu di metilene, agar desossicolato); su TSA (Tryptone Soya Agar) forma, dopo 24 h a 36 °C, colonie di diametro compreso tra 2-3 mm, mentre dopo 24 h a 25 °C forma colonie di dimensioni più piccole (diametro da 1mm a 1,5 mm), in entrambi i casi con una caratteristica pigmentazione giallo brillante non diffusibile. La produzione di pigmento però è maggiore a 25 °C che a 36 °C (Farmer *et al.*, 1980, Nazarowec-White *et al.*, 2003, Iversen e Forsythe 2003). Il microrganismo cresce anche su piastre di agar-cioccolato incubato a 35 °C per 48 h in atmosfera modificata (10% CO₂); subcolture su agar-sangue di pecora, incubate overnight, danno luogo a colonie di 2-3 mm di diametro, marroni, opache, convesse, non emolitiche.

Le colonie di neoformazione mostrano un diverso aspetto: un tipo si presenta con la superficie rugosa o un aspetto mucoide, mentre un altro tipo presenta la superficie liscia ed è facilmente asportabile con l'ansa; le colonie del primo tipo, però, dopo essere state subcolturate mostrano anch'esse la superficie liscia tipica. Non è noto se a questo diverso aspetto della colonia corrispondano differenti caratteri o differenze nella virulenza (Iversen e Forsythe, 2003).

La temperatura massima di crescita varia tra 41 e 45 °C; il valore di temperatura più basso al quale è stata invece associata la crescita si colloca tra 5,5 e 8 °C. Per questa ragione è considerato un vero mesofilo (CAC, 2004; Joint FAO/WHO, 2004).

È stato osservato che dopo 24 h di incubazione in Trypticase Soy Broth (TSB) tutti i ceppi di *Ent. sakazakii* producono una notevole quantità di sedimento che sembra contenere masse amorfe e raggruppamenti di colonie.

Di recente si è potuto osservare che *Ent. sakazakii* cresce anche nel latte UHT e che, 10-15 cellule addizionate a 500 mL di latte e incubate a 30 °C, acidificano il latte per produzione di lattato (Iversen e Forsythe, 2003).

Come altri membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, anche *Ent. sakazakii* possiede un gene, organizzato in un operone (bcsABZC operon), cui si deve la produzione di materiale extracellulare di natura cellulosa, responsabile delle interazioni cellula-cellula e dell'adesione della cellula batterica alle superfici idrofiliche e idrofobiche abiotiche. La produzione di questo materiale, peraltro sintetizzato sia a 28 °C che a 37 °C, è stata correlata alla capacità del microrganismo di resistere all'ambiente acido dello stomaco (Zogaj *et al.*, 2003).

Ent. sakazakii presenta anche una capsula composta da eteropolisaccaridi (29-30%acido glucuronico, 23-30% glucosio, 19-24% galattosio, 13-22% fucosio, 0-8% mannosio) cui probabilmente si deve la sopravvivenza del microrganismo nel latte in polvere fino a 24 mesi. La capsula, inoltre, è responsabile dell'adesione alle superfici e della formazione di un biofilm che lo rende più resistente agli agenti disinfettanti. La produzione ottimale della capsula si ha in presenza di basse concentrazioni di azoto (Iversen e Forsythe, 2003).

Fino al 1980, *Ent. sakazakii* era considerato una variante giallo-pigmentata dell'*Ent. cloacae* data la peculiare caratteristica di formare colonie di colore variabile dal giallo brillante al giallo pallido. Solo negli ultimi anni, grazie a Farmer *et al.* (1980), è stato riconosciuto come specie distinta in base ai risultati dell'ibridazione DNA-DNA, delle reazioni biochimiche, della produzione di pigmento e della sensibilità agli antibiotici. La nuova specie è stata dedicata dai

ricercatori, al batteriologo giapponese *Riichi Sakazakii* per il grande contributo che ha dato alla comprensione della biologia delle *Enterobacteriaceae* e delle *Vibrionaceae* (Farmer *et al.*, 1980).

Caratteri biochimici

In base ai test biochimici convenzionali o miniaturizzati (API 20E), l'*Ent. sakazakii* risulta positivo ai seguenti test: reazione di Voges-Proskauer, citrato, deossiribonucleasi (reazione ritardata di 4 giorni), fenilalanina deaminasi (reazione debole), glucosio, lattosio, mannitolo, salicina, inositolo, ramnosio, trealosio e xilosio; negativo, invece, per le seguenti reazioni: indolo, idrogeno solforato, urea e malonato. Caratteristica peculiare dell'*Ent. sakazakii* è l'assenza dell'enzima fosfamidasi (Kleiman *et al.*, 1981).

La produzione di pigmento giallo, la reazione negativa al test di fermentazione del sorbitolo, la reazione ritardata alla deossiribonucleasi e, come suggeriscono alcuni autori (Nazarowec-White e Farber, 1997a), anche la produzione di Tween 80 esterasi, sono i test specifici per discriminare *Ent. sakazakii* da *Ent. cloacae*. Dato che altre specie di *Enterobacteriaceae*, tra cui *Escherichia coli* e *Ent. agglomerans*, producono pigmento giallo, questa caratteristica da sola non può essere utilizzata per differenziarlo dalle altre specie senza ricorrere ad ulteriori test.

In base ai risultati di diverse reazioni biochimiche *Ent. sakazakii* è stato diviso in 15 biogruppi (Farmer *et al.*, 1980). Il biogruppo 1, il più diffuso, si caratterizza per la positività alle seguenti reazioni biochimiche: test dell'inositolo e dell'ornitina, produzione di gas e di nitrito, reazione di Voges-Proskauer e dell'alfa-metil glucoside; dà, invece, reazione negativa al test dell'indolo e alla produzione di malonato e di dulcitol. Attualmente, viene tipizzato con le più moderne tecniche di biologia molecolare che permettono una più efficiente differenziazione tra ceppi (Bruce, 1996; Clark *et al.*, 1990; Nazarowec-White e Farber, 1999; The DuPont Qualicon, 2004).

In base al profilo enzimatico, tutti i ceppi di *Ent. sakazakii* sono α -glucosidasi positivi e fosfoamidasi negativi (Muytjens *et al.*, 1988); questi due caratteri rendono possibile una sua rapida identificazione e differenziazione dalle altre *Enterobacteriaceae* (Tabella 1) (Nazarowec-White e Farber, 1997a).

Tabella 1. Differenze biochimiche tra le varie specie di *Enterobacter*^a

Test	Reazioni ^b di <i>Enterobacter</i>				
	<i>sakazakii</i>	<i>cloacae</i>	<i>aerogenes</i>	<i>agglomerans</i>	<i>gergoviae</i>
Lisina decarbossilasi	-	-	+	-	+
Arginina diidrolasi	+	+	-	-	-
Ornitina decarbossilasi	+	+	+	-	+
Crescita in KCN	+	+	+	V	-
Fermentazione di:					
<i>Saccarosio</i>	+	+	+	(+)	+
<i>Dulcitol</i>	-	(-)	-	(-)	-
<i>Adonitolo</i>	-	(-)	+	-	-
<i>Rafnosio</i>	+	+	+	V	+
<i>D-sorbitolo</i>	-	+	+	V	-
<i>X-metil-D-glucoside</i>	+	(+)	-	-	-
<i>D-arabitol</i>	-	(-)	+	-	+
Produzione di pigmento giallo	+	-	-	(+)	-

^a Adattato da Farmer e Kelly, 1992

^b +: indica il 90-100% di positività; (+): 75-89% di positività; V: 25-74% di positività; (-): 10-24% di positività; -: 0-9% di positività.

Habitat

Il microrganismo è stato isolato da un'ampia varietà di fonti: alimenti (formaggi, tofu, pane fermentato, carne affumicata, carne macinata, salsiccia, tè, riso), ambiente (suolo, acqua), animali (ratti e mosche), liquidi biologici (liquido cerebro-spinale, sangue, midollo osseo, espettorato, urina, appendice infiammata, tratti intestinale e respiratorio, occhi, orecchie, feci) e ambiente ospedaliero (reparto preposto alla preparazione del latte in polvere, stetoscopio, spazzolini per la pulizia dei biberon) (Iversen e Forsythe, 2003).

Non è stato, invece, mai isolato da fango, legno marcio, grano, mangime per uccelli, roditori, bestiame e latte non trattato (Kandhai *et al.*, 2004).

Ent. sakazakii è presente anche nell'ambiente di produzione di latte in polvere, cereali, cioccolato, farina e pasta, così come nell'ambiente domestico a dimostrazione della sua l'ampia diffusione (Kandhai *et al.*, 2004).

L'isolamento dall'intestino delle larve della mosca *Stomoxys calcitrans* testimonia che esiste una riserva ambientale del microrganismo piuttosto abbondante e, a sua volta, che l'insetto, avendo un'ampia distribuzione geografica, può veicolarlo in teoria in ogni ambiente (Hamilton *et al.*, 2003).

Fattori di virulenza

I diversi generi della famiglia delle *Enterobacteriaceae* possiedono diversi fattori di virulenza; tra i più importanti, si ricordano: gli antigeni somatici, le adesine, la resistenza al siero, l'enterotossine, le colicine, i siderofori, l'emolisina, la lipasi e la DNAsi. In tutti i casi, è necessario che il microrganismo sia capace di sopravvivere all'ambiente acido dello stomaco e di superare l'epitelio intestinale perché possa essere attivato il meccanismo di patogenicità (Keller *et al.*, 1998).

Già nell'*Ent. cloacae* (specie geneticamente correlata all'*Ent. sakazakii*) si riconoscono come fattori di virulenza un'esotossina, un'aerobactina e un'emoagglutinina (Keller *et al.*, 1998). Nell'*Ent. sakazakii*, in effetti, è stata di recente dimostrata una tossina, ovvero un'enterotossina, responsabile dell'infettività. È stato ipotizzato che questa tossina, una volta superata la barriera gastrica, raggiunga l'epitelio intestinale dove, sotto il controllo di una proteina regolatrice, si legherebbe ai recettori dell'ospite. Come succede per le tossine prodotte da altre specie di *Enterobacter*, anche quest'ultima potrebbe essere codificata da un plasmide (Pagotto *et al.*, 2003).

In ogni caso, una coltura pura di *Ent. sakazakii* inoculata in topini per via orale alla concentrazione di 10^5 UFC (Unità Formanti Colonie) e per via intraperitoneale alla concentrazione di 10^3 UFC, provoca la morte dell'ospite (Nazarowec-Witthe e Farber, 1997a).

Resistenza al calore e a condizioni ambientali sfavorevoli

In generale, la resistenza dei batteri al calore è assicurata da diversi fattori tra cui le condizioni fisiologiche, la temperatura di crescita, la composizione del substrato, in particolare la concentrazione dei grassi e degli zuccheri (Nazarowec-Witthe e Farber, 1997b).

Studi recenti confermano che l'*Ent. sakazakii* presenta una termotolleranza maggiore di quella di altri patogeni enterici; è, però, meno termotollerante della *Listeria monocytogenes* (Iversen e Forsythe, 2003).

La relativa resistenza al calore del microrganismo è associata ad un numero piccolo di determinanti genici; questo dato emerge dai risultati di una prova sperimentale in cui 12 ceppi esposti al calore umido si distinguono solamente per due diversi caratteri fenotipici (Edelson-Mammel e Buchanan, 2004).

Convenzionalmente si indica con D (tempo di riduzione decimale) la resistenza termica dei microrganismi; tale simbolo indica il numero di minuti, che ad un determinato valore di temperatura, sono necessari per ridurre del 90% il numero dei microrganismi. I valori di $D_{58^{\circ}\text{C}}$ per l'*E. sakazakii* calcolati da vari AA (Nazarowec-White e Farber, 1997b; Breeuwer *et al.*, 2003; Edelson-Mammel e Buchanan, 2004; Iversen *et al.* 2004) variano da 0,3 a 9.9 minuti. L'aumento della temperatura necessario per ridurre ad 1/10 il valore di D viene chiamato valore z (espresso in °C). I valori sperimentali calcolati da diversi AA (Nazarowec-White e Farber, 1997b; Breeuwer *et al.*, 2003; Edelson-Mammel e Buchanan, 2004; Iversen *et al.*, 2004) indicano un valore z compreso tra 3,1 e 5,8 °C. La variabilità dei risultati è in parte legata al diverso metodo sperimentale utilizzato e alla diversa termosensibilità dei ceppi impiegati.

L'*Ent. sakazakii*, però, non sopravvive al processo di pastorizzazione (il trattamento termico del latte che può avvenire a 71,6 °C per 15"); infatti, alla temperatura di 72 °C resiste soltanto per 1,3 secondi circa (Nazarowec-White e Farber, 1997b).

Questo risultato ha fatto ipotizzare, quindi, che l'eventuale contaminazione del latte in polvere possa avvenire durante le fasi successive alla pastorizzazione e verosimilmente durante la manipolazione per la preparazione del prodotto finito.

Inoltre, uno studio recente ha dimostrato che reidratando il latte formulato in polvere con acqua alla temperatura di ≥ 70 °C si ha una riduzione di 4 log della carica iniziale di *Ent. sakazakii*, mentre quando la temperatura dell'acqua è di 50 °C non si ha alcuna inattivazione (Edelson-Mammel e Buchanan, 2004). Dal momento che le istruzioni riportate sulle confezioni presenti in commercio riguardo le modalità di ricostituzione dei latti formulati in polvere non prevedono l'impiego di acqua ad una temperatura appropriata per l'inattivazione del microrganismo, è stata prospettata l'opportunità che le imprese produttrici revisionino in maniera appropriata le modalità di ricostituzione di questa tipologia di prodotto.

L'*Ent. sakazakii* mostra anche una certa attitudine all'osmotolleranza; questa sua capacità di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli fa aumentare il rischio di una contaminazione post-processo. Questa proprietà, inoltre, favorirebbe la sopravvivenza del microrganismo nel latte in polvere, un substrato che possiede un'attività dell'acqua (a_w) di circa 0,2 (Breeuwer *et al.*, 2003).

Nel latte formulato in polvere mantenuto a temperatura ambiente in contenitore ben chiuso, il microrganismo può sopravvivere per circa un anno e mezzo (Edelson-Mammel e Buchanan, 2004).

La resistenza all'essiccamento è stata messa in relazione con l'aumento intracellulare della concentrazione di trealosio, un disaccaride del glucosio che sembra stabilizzare le proteine e i fosfolipidi della membrana batterica. È stato, infatti, osservato che la concentrazione di trealosio passa da 0,040 mol/mg di proteina nella fase stazionaria di crescita e in ambiente umido (condizioni fisiologiche), a 0,23 mol/mg di proteina nella fase stazionaria e in ambiente secco (condizioni di stress) (Breeuwer *et al.*, 2003).

Tempi di duplicazione

Diversi autori riportano che il tempo di duplicazione dell'*Ent. sakazakii* a 23 °C è di 40 minuti e a 10 °C è compreso tra 4,18 ore e 5,52 ore; invece, a 4 °C non si ha crescita (Nazarowec-Withe e

Farber, 1997c, Nazarowec-Withe *et al.*, 2003). È stato ripetutamente dimostrato che la temperatura interna dei frigoriferi domestici spesso è più elevata di quella indicata dal display o prevista nel libretto di istruzione (in genere varia tra 7 e 10 °C): questi valori consentono, invece, la moltiplicazione dell'*Ent. sakazakii* (Nazarowec-Withe e Farber, 1997c).

Nel latte formulato ricostituito e mantenuto a temperatura ambiente (25 °C), il microrganismo ha un tempo di duplicazione di circa 75 minuti; mentre i tempi di duplicazione dei ceppi clinici e alimentari sono 13,7 h a 6 °C, 1,7 h a 21 °C e 19-21 min a 37 °C (Iversen *et al.*, 2004). Al confronto, i tempi di duplicazione degli altri microrganismi che più frequentemente si possono riscontrare in latte e derivati risultano più lunghi.

È stato dimostrato che partendo da una concentrazione iniziale di 1 UFC/mL *Ent. sakazakii* raggiunge in 10 ore la concentrazione di 10⁷ UFC/mL di latte in polvere ricostituito e lasciato a temperatura ambiente. Il valore ottenuto è prossimo a quello della dose minima letale (DL nel topo =10⁸ UFC).

Non si conosce attualmente come la variazione del pH e dell'attività dell'acqua influenzino la moltiplicazione del microrganismo (Iversen e Forsythe, 2003).

Sensibilità agli antibiotici

Nonostante *Ent. sakazakii* sia sensibile alla terapia antibiotica comunemente impiegata per il trattamento dell'infezione, alcuni Autori (Burgos e Varala, 2002) di recente hanno segnalato un aumento dell'antibiotico-resistenza.

Un primo studio condotto nel 1986 (Tabella 2), per valutare la concentrazione minima inibente (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) di 29 molecole, con il metodo della "diluizione in agar", ha dimostrato che *Ent. sakazakii* era sensibile a tutti gli agenti testati, tranne che alla cefalotina e al sulfametozazolo (Muytjens e Van Der Ros-Van De Repe, 1986).

Tabella 2. *Ent. sakazakii*: sensibilità agli antibiotici

Farmaco	MIC* (µg/mL) per <i>Ent. sakazakii</i> (195 ceppi)		
	range	50%	90%
Ampicillina	0,25->128	2	4
Cefaloridina	2-128	8	16
Cefalotina	2->128	64	128
Cefamandolo	≤0,125->128	2	4
Cefoperazone	≤0,125-16	1	2
Ceforanide	≤0,125->128	1	2
Cefotaxime	≤0,03-0,5	0,125	0,125
Cefoxitin	0,5->128	8	16
Cefsulodin	2->128	32	32
Ceftazidime	≤0,03-1	0,125	0,25
Ceftizoxime	≤0,125-1	≤0,125	≤0,125
Ceftriaxone	≤0,03-0,5	0,06	0,125
Cefuroxime	0,25-32	4	8
Cloramfenicolo	1->128	8	16
Ciprofloxacina	≤0,06-0,25	≤0,06	≤0,06
Doxiciclina	1-32	4	4
Gentamicina	0,06-1	0,25	0,5

*MIC necessaria per inibire il 50% e il 90% dei ceppi

Più recentemente (2001) invece, un lavoro di Lai dimostra che l'*Ent. sakazakii* è resistente all'ampicillina, alla cefazolina e alle penicilline ad ampio spettro, sensibile agli aminoglicosidi e al trimetoprim-sulfametoxazolo, mentre risulta variabile la sensibilità alle cefalosporine di terza generazione e ai chinoloni. Per questa ragione l'Autore ha proposto il ricorso ai carbapenemi e alle cefalosporine di terza generazione associate ad un aminoglicoside o al trimetoprim più sulfametoxazolo per il trattamento della meningite. Tuttavia, un successivo lavoro (Block *et al.*, 2002), su un ceppo di *Ent. sakazakii* isolato da un'infezione, mostra la resistenza del microorganismo a vari antibiotici quali: ampicillina, gentamicina e cefotaxamina.

Nello stesso anno (2002) è stato condotto uno studio per verificare la sensibilità "naturale" di 107 ceppi di *Enterobacter*, (*Ent. gergoviae*, *Ent. amnigenus*, *Ent. cancerogenus* ed *Ent. sakazakii*), nei confronti di 69 agenti antimicrobici. Tutte le specie batteriche sono risultate naturalmente sensibili a: tetracicline, aminoglicosidi, antibiotici beta-lattamici (acilureidopenicilline, ticarcillina, ampicillina/sulbactame, alcune cefalosporine, carbapenemi, aztreoname), chinoloni, antifolati, cloramfenicolo, e nitrofuratoina; mentre sono risultate naturalmente resistenti a: oxacillina, penicillina G, alcuni macrolidi, lincosamidi, streptogamine, rifampicina e acido fusidico (Stock e Wiedemann, 2002).

L'antibiotico resistenza di *Ent. sakazakii* sembra essere sotto il controllo di un plasmide e di un integrone (Girlich *et al.*, 2001).

Sensibilità ad altri agenti

Ent. sakazakii è sensibile all'attività antibatterica dei chitosani e degli oligomeri dei chitosani, biopolimeri naturali non tossici che derivano dalla deacetilazione della chitina. Utilizzati in medicina, nell'industria chimica e alimentare per la loro attività antimicrobica, antitumorale e ipocolesterolemizzante, vengono impiegati nel processo di produzione del tofu, un formaggio derivato dalla soia, aumentandone la *shelf-life* e inibendo la flora batterica contaminante costituita da *Bacillus* spp. e dall'*Ent. sakazakii* (No *et al.*, 2002).

Dose infettante

Non ci sono evidenze epidemiologiche che permettano di stabilire il valore preciso della dose infettante; tuttavia, si stima che già 1000 cellule di *Ent. sakazakii* siano capaci di provocare l'infezione (Iversen e Forsythe, 2003).

È molto improbabile che i bassi livelli di contaminazione ($\leq 0,36$ cellule *Ent. sakazakii*/100 g prodotto) comunemente riscontrati nel latte formulato in polvere (Muytjens *et al.*, 1988, Nazarowec-Withe *et al.*, 2003), possano causare infezione, a meno che il prodotto non venga lasciato a temperatura di abuso o non sia contaminato durante la preparazione/manipolazione del prodotto.

Epidemiologia

Ent. sakazakii causa infezioni in tutte le fasce di età anche se i neonati rappresentano la fascia di popolazione maggiormente a rischio.

Fino ad oggi, sono un po' meno di 60 i casi di infezione segnalati nel mondo (Farber, 2004); tuttavia, si deve tener presente il fatto che il numero dei casi di infezione da *Ent. sakazakii* possa essere sottostimato in quanto la ricerca di questo patogeno non viene effettuata da tutti i laboratori di analisi cliniche e non tutti i Paesi hanno un sistema di notifica dei casi di malattia.

In passato, la percentuale di mortalità conseguente alle infezioni da *Ent. sakazakii* era superiore al 50%; negli ultimi anni essa è diminuita, anche se rimane comunque relativamente alta (20%), (CAC, 2003).

I primi due casi di meningite dovuti a *Ent. sakazakii*, risalgono al 1961, quando il microrganismo era denominato *Ent. cloacae* (Biering *et al.*, 1989). Da allora, casi di malattia dovuti all'*Ent. sakazakii* sono stati segnalati un po' in tutto il mondo con un incremento delle segnalazioni negli ultimi anni, probabilmente per l'aumento dei soggetti a rischio e delle migliorate capacità diagnostiche (Tabella 3) (Nazarowec-Withe *et al.*, 2003).

Nel complesso, i casi fino ad oggi segnalati possono essere divisi in due gruppi: sporadici e epidemici (Nazarowec-Withe *et al.*, 2003).

Tabella 3. Casi sporadici ed epidemici di infezioni neonatali nel mondo

Luogo	Anno	Numero dei casi (decessi)	Sorgente implicata
Casi sporadici			
USA	1981	1(0)	Sconosciuta
Grecia	1982	2(0)	Feci
Paesi Bassi	1983	1(1)	Latte in polvere per l'infanzia
Canada	1990	2(0)	Sconosciuta
Israele	1999-2000	2(0)	Mescolatore
Belgio	2002	1(1)	Latte in polvere per l'infanzia
Epidemie			
Paesi Bassi	1983	8(6)	Canale del parto
Grecia	1984	11(4)	Sconosciuta
USA	1988	4(0)	Latte in polvere per l'infanzia
Islanda	1986-1987	3(1)	Latte in polvere per l'infanzia
Canada	1990	2(?)	Sconosciuta
Belgio	1998	12(2)	Latte in polvere per l'infanzia
USA	2001	10(1)	Latte in polvere per l'infanzia
Israele	2001	5(0)	Mescolatore

Nel 1981, un caso di meningoencefalite necrotizzante aggravata da compartimentalizzazione ventricolare e formazione di ascessi causata da *Ent. sakazakii*, in una neonata di 5 settimane, ricoverata presso il Dipartimento di Pediatria della Facoltà di Medicina di Indianapolis (USA), ha contribuito a confermare la patogenicità del microrganismo (Kleiman *et al.*, 1981).

Nel 1982 *Ent. sakazakii* fu isolato per la prima volta in Grecia da campioni di feci appartenenti a due ragazzi talassemici.

Nel 1983, un'indagine retrospettiva condotta nei Paesi Bassi su 8 casi di meningite neonatale dovuta a *Ent. sakazakii*, verificatisi nei sei anni precedenti, permise di stabilire che la malattia aveva un indice di mortalità molto alto (75%); i ceppi erano sensibili al trattamento con beta-lattamici piuttosto che a quello con l'ampicillina; e la trasmissione dell'infezioni nella maggior parte dei casi era avvenuta attraverso il canale del parto (Muytjens *et al.*, 1983).

Alla fine del 1984, un'altra epidemia da *Ent. sakazakii* segnalata in Grecia, nella quale rimasero coinvolti 11 neonati, contribuì a fare includere *Ent. sakazakii* nella lista delle specie

microbiche da ricercare in occasione di infezioni da germi gram-negativi, (anche se non permise di identificare la sorgente e le modalità di diffusione del microrganismo), (Arseni *et al.*, 1987).

Tra il 1986 e il 1987, tre casi di infezione neonatale da *Ent. sakazakii* verificatisi in Islanda permisero di associare l'infezione al consumo di latte in polvere contaminato usato nell'ospedale. Studi condotti con tecniche di biologia molecolare dimostrarono che il ceppo isolato dal latte era identico a quello isolato dai pazienti (Biering *et al.*, 1989).

Nel 1988 un'epidemia verificatasi nel Reparto di Pediatria dell'Ospedale di Memphis, Tennessee (USA), confermò che responsabile della sepsi era il latte in polvere contaminato (Simmons *et al.*, 1989).

Altri due casi di meningite neonatale causata da *Ent. sakazakii* si verificarono nel dicembre del 1990 in due ospedali canadesi (Nazarowec-Withe e Farber, 1997a).

Più recentemente, nel 1998, un'epidemia di enterocolite necrotizzante, caratterizzata da necrosi e pneumatosi intestinale, si è verificata nel reparto di terapia intensiva neonatale di un ospedale belga. L'infezione ha interessato 12 neonati ed è risultata fatale per due di loro. L'agente causale è stato isolato dall'aspirato gastrico, dai tamponi rettali e dal sangue di sei dei dodici pazienti. I test di tipizzazione molecolare, hanno permesso di stabilire che il profilo genico dell'*Ent. sakazakii*, isolato dai campioni clinici, era sovrapponibile a quello del ceppo isolato dai campioni di latte in polvere usato per l'alimentazione dei neonati (Van Acker *et al.*, 2001).

Tra il dicembre 1999 e il gennaio 2000 due casi di infezione da *Ent. sakazakii* in due neonati pre-termine, alimentati con latte in polvere, sono stati segnalati da un ospedale pediatrico di Gerusalemme (Israele). Il microrganismo, però, non fu isolato dal latte, ma dal "miscelatore", usato per la sua ricostituzione, che risultò danneggiato. Il caso ha suscitato grande interesse nella comunità scientifica perché l'infezione era stata causata da una variante biochimica del microrganismo (negativo al test dei nitrati generando profili API 20E atipici), resistente alla cefazolina, ma suscettibile a penicilline, cefalosporine, carbapenemici, fluorochinoloni, aminoglicosidi, tetraciline, trimetoprim-sulmetoxazolo, cloramfenicolo, e beta-lattamasi positivo; ciò fece ipotizzare l'esistenza di diversi biotipi circolanti quali agenti infettanti (Block *et al.*, 2002).

Nell'aprile 2001 la presenza di *Ent. sakazakii* nel liquido cerebrospinale di un neonato nato prematuro e sottoposto a terapia intensiva in un ospedale pediatrico del Tennessee (USA) permise di scoprire che l'infezione era diffusa anche tra i 49 neonati degenti dello stesso reparto (Baker, 2002). Furono identificati, così, 9 casi clinici: due di infezione sospetta (coltura *Ent. sakazakii*-positiva da siti non sterili traumatizzati, quale l'aspirato tracheale) e sette di soggetti colonizzati (coltura *Ent. sakazakii*-positiva da siti non sterili non traumatizzati, quali feci e urine). Tra i possibili fattori di rischio presi in considerazione per accertare le cause dell'infezione furono inclusi: l'età gestazionale, il peso alla nascita, l'incubatrice, il ventilatore, le medicazioni orali e il tipo di alimentazione (allattamento al seno, somministrazione di latte in polvere o liquido, alimentazione parenterale). Si accertò così che solo i campioni di latte in polvere prelevati sia da confezioni già aperte, sia da quelle integre, dello stesso tipo di quello utilizzato per alimentare i neonati, erano contaminati da *Ent. sakazakii*; nessun campione ambientale (superfici di lavoro e acqua) risultò contaminato. Anche in questo caso, l'analisi molecolare confermò l'uguaglianza dei ceppi clinici e alimentari. In base a questi risultati, l'ospedale decise di sostituire la formula in polvere, maggiormente soggetta a manipolazione e quindi a contaminazione, con la formula liquida. Nel marzo 2002 la ditta produttrice della formulazione in polvere decise il ritiro del prodotto dal commercio.

Nel 2002 sono stati identificati altri 5 episodi di infezione da *Ent. sakazakii*, in un ospedale di Gerusalemme (Israele), con quadri clinici molto diversi: dall'infezione asintomatica, alla

sepsi e all'infezione del sistema nervoso centrale. Ancora una volta la sorgente di contaminazione è risultata essere il "miscelatore" utilizzato per ricostituire il latte in polvere.

L'ultimo caso di infezione da *Ent. sakazakii*, trasmesso con il latte in polvere fino ad oggi descritto, risale al marzo 2002 e ha interessato un neonato belga di 5 giorni nato a termine e in buone condizioni di salute, deceduto per meningite (CAC, 2003).

ENTEROBACTER SAKAZAKII: PATOLOGIE, TRASMISSIONE E IDENTIFICAZIONE

Manifestazioni cliniche

Le *Enterobacteriaceae* e, in particolare, i generi *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* spp, tutti componenti della flora microbica intestinale umana, sono la più importante famiglia di batteri gram-negativi responsabile di infezioni delle vie biliari, della prostata, del tratto urinario, in genere conseguenti all'uso di cateteri, e delle più comuni infezioni nosocomiali. L'intestino è la principale sorgente di disseminazione e trasmissione di questi potenziali patogeni ai siti sensibili (Zogaj *et al.*, 2003).

Tra i membri della stessa famiglia, *Ent. sakazakii* è considerato un patogeno opportunista a carattere invasivo responsabile di importanti malattie quali la sepsi, le meningiti e, più raramente, l'enterocolite necrotizzante (NEC), soprattutto nei neonati (prematuro, nati con basso peso, affetti da deficit del sistema immunitario) e di infezioni nosocomiali, specialmente nei reparti di terapia intensiva pediatrica dove causa il 50% delle infezioni.

Tra queste, la meningite è la forma di infezione più grave. La via seguita dal patogeno, per arrivare al liquido cerebro-spinale e causare la meningite, non è stata ancora stabilita. Si ipotizza che il plesso carotideo sia il più probabile sito di ingresso e che le modalità di invasione coinvolgano meccanismi para- e trans-cellulari. I metaboliti batterici come i glicopeptidi, le endotossine, le proteasi, le collagenasi e l'elastasi, sembrano indurre la permeabilità delle barriere ematica e cerebrale facilitando, di conseguenza, l'ingresso del patogeno. Negli stadi avanzati della malattia le manifestazioni patologiche più frequentemente riscontrate sono: ventricoliti, ascessi cerebrali, formazione di cisti, idrocefalo, quadriplegia, ritardato sviluppo neurale e infarto.

Al pari degli altri patogeni che causano meningiti in bambini al di sotto dei 5 anni (pneumococco, *Haemophilus* e meningococco), anche *Ent. sakazakii* ha un particolare tropismo per il sistema nervoso centrale e, per la sua tendenza a causare lesioni cerebrali, è stato paragonato a *Citrobacter diversus*.

L'enterocolite necrotizzante neonatale rappresenta l'altra importante manifestazione patologica nei neonati ed è caratterizzata da necrosi e pneumatosi intestinale. L'incidenza della malattia è del 13% nei neonati con basso peso alla nascita.

I prerequisiti necessari coinvolti nella patogenesi di tale malattia sembrano essere: ischemia intestinale neonatale, colonizzazione microbica dell'intestino e eccesso di proteine nel lume intestinale associato alla somministrazione di latti formulati per l'infanzia. La frequenza di enterocoliti necrotizzanti in neonati alimentati con latti artificiali è dieci volte superiore rispetto a quella in neonati alimentati con latte materno, ciò può essere spiegato dalla presenza delle immunoglobuline protettive di classe A in quest'ultimo.

Sia la meningite che l'enterocolite necrotizzante presentano un'elevata percentuale di mortalità; in particolare, quella legata all'enterocolite necrotizzante varia dal 10 al 55%, mentre quella relativa alla meningite varia dal 40 all'80%.

Teoricamente le infezioni neonatali da *Ent. sakazakii* potrebbero essere acquisite direttamente dalla madre al momento del parto; tuttavia, non sono stati segnalati casi di infezione del tratto intestinale e delle vie genitali di madri di neonati infetti. Per contro, sono stati riportati casi di infezioni neonatali dopo parto cesareo (Bar-Oz *et al.*, 2001); comunque, la

colonizzazione dei neonati, soprattutto dei neonati pre-termine, con batteri di origine umana e ambientale è quasi inevitabile.

I segni e i sintomi della fase iniziale delle infezioni da *Ent. sakazakii* sono: inappetenza, irritabilità, ittero, respiro affannoso, pallore, cianosi, collasso, spasmi e instabilità della temperatura corporea (Bar-Oz *et al.*, 2001).

Popolazione a rischio

Anche se l'*Ent. sakazakii* provoca malattie in tutte le fasce di età, in particolare in quella dei soggetti compresa tra 0 e 12 mesi, sono i nati pre-termine a meno di 36 settimane di gestazione, i nati con basso peso, gli immunocompromessi, i nati da madri HIV-positive e i neonati a termine ospedalizzati nei reparti di terapia intensiva i soggetti maggiormente a rischio di contrarre l'infezione. Ciò è dovuto al fatto che questi, nella maggior parte dei casi, vengono alimentati con latte in polvere. Come sopra ricordato, questo alimento rappresenta il più importante veicolo di trasmissione del microrganismo che riesce facilmente a superare la barriera gastrica e causare l'infezione, in quanto il pH dello stomaco dei neonati risulta meno acido di quello degli adulti.

Non mancano, comunque, casi di malattia tra i nati a termine sani o affetti da anomalie congenite, e quindi più suscettibili all'infezione. Tra gli adulti infettati, la malattia a decorso generalmente grave (fino ad oggi, però, non sono stati segnalati casi di meningite) si sviluppa solo nel 50% dei casi; non sono però noti il veicolo e la dose infettante.

Si stima che l'incidenza dell'infezione da *Ent. sakazakii* tra i neonati possa essere 1 su 100.000 nati mentre, in quelli con basso peso alla nascita l'incidenza passa a 8,7 su 100.000. In effetti, sono proprio questi ultimi i soggetti più a rischio: uno studio condotto nel Regno Unito dimostra che il 52% dei casi verificatisi tra il 1961 e il 2003 era rappresentato proprio da questi ultimi, peraltro tutti direttamente collegati all'uso di latte formulato in polvere.

Veicolo alimentare

Anche se non sono noti tutti veicoli coinvolti nella trasmissione di *Ent. sakazakii*, i numerosi dati disponibili in letteratura indicano il latte formulato in polvere per l'infanzia come la fonte maggiormente coinvolta.

Si tratta come è noto di preparazioni a base di latte vaccino o di soia denominati "formule per l'infanzia" opportunamente standardizzate in taluni componenti in modo da soddisfare le particolari esigenze nutrizionali dei neonati cui sono destinati e promuoverne la normale crescita e sviluppo; vengono utilizzate per sostituire, modificare e fortificare il latte umano.

Queste formule vengono impiegate quando i neonati non possono ricevere il latte materno o non ne hanno disponibilità. In Europa, i requisiti essenziali delle formule sono indicati nell'*Infant Formulae Directive*. Secondo tale documento, si definiscono "formule per l'infanzia" quei prodotti destinati all'alimentazione dei neonati durante i primi quattro-sei mesi di vita; si usa invece il termine "latte di proseguimento" per indicare quei prodotti destinati all'alimentazione dei neonati di età superiore ai quattro mesi e dei bambini durante il periodo dello svezzamento (*European Commission*, 2003).

Il latte formulato in polvere è un prodotto non sterile che, un volta reidratato, rappresenta un buon terreno di crescita per il microrganismo. Il processo di produzione, al contrario di quello adottato per le formule liquide, può essere soggetto a contaminazione batterica, in quanto non prevede condizioni tali da consentire di ottenere un prodotto finito commercialmente sterile. Il

ciclo di produzione prevede la possibilità di utilizzare tre distinti processi (Joint FAO/WHO, 2004):

– *Miscelazione delle sostanze liquide e solubilizzate*

In questo processo tutti gli ingredienti (latte, derivati, isolati proteici della soia, grassi, minerali, vitamine e additivi) allo stato liquido o solido vengono riuniti per formare una miscela liquida, trattata termicamente (pastorizzata a 71,6 °C per 15” o a 74,4 °C per 25”, quest’ultimo processo utilizzato con prodotti contenenti amidi o altri addensanti o a 105-125°C per almeno 5”), omogeneizzata e mantenuta refrigerata, prima di essere essiccata mediante essiccazione a spruzzo in una torre contro corrente di aria calda.

– *Miscelazione delle sostanze in fase solida*

In questo processo tutti gli ingredienti sono sottoposti separatamente a trattamento termico, essiccati e, infine, mescolati.

– *Processo combinato*

Si tratta di un processo nel quale vengono adottate tutte e due le procedure precedenti; infatti, ad una parte degli ingredienti ottenuta utilizzando la “miscelazione delle sostanze liquide” si aggiunge il resto preparato con la “miscelazione delle sostanze solide”.

Per descrivere le corrette modalità di preparazione del latte, le confezioni riportano dettagliate istruzioni accompagnate spesso da schematiche illustrazioni dei passaggi da effettuare per reidratare il prodotto in maniera appropriata. Generalmente, le istruzioni prevedono di preparare il biberon immediatamente prima della poppata, bollire l’acqua, e versarla nel biberon pulito lasciandola raffreddare fino a raggiungere una temperatura di circa 40-50 °C, di aggiungere la polvere di latte, di agitare energicamente per favorire la solubilizzazione, di raffreddare ulteriormente il latte reidratato fino a raggiungere la temperatura idonea alla somministrazione, di somministrare nel più breve tempo eliminando l’eventuale rimanenza. La raccomandazione di bollire e raffreddare l’acqua prima di aggiungere il quantitativo di latte in polvere risponde a diverse ragioni: in primo luogo ad assicurare l’impiego di un’acqua di buona qualità batteriologica (proprio per questo motivo, spesso si ricorre all’uso di acque minerali); inoltre a preservare la stabilità degli ingredienti più termolabili presenti nella formula; ad evitare la formazione di grumi che possono presentarsi con taluni ingredienti; infine, aspetto non trascurabile, assicura che il neonato non si possa scottare.

Non è da escludere la possibilità che i genitori preparino più poppate, (in alcuni casi tutte quelle previste per un’intera giornata) mantenendole in frigorifero e riscaldandole al momento dell’uso fino ad intiepidire il latte prima di somministrarlo.

Non si è a conoscenza del fatto che esistano per gli ospedali o per gli asili nido specifiche modalità di preparazione e conservazione del latte reidratato.

Negli USA le istituzioni competenti si adoperano per assicurare che le unità ospedaliere preposti alla preparazione e manipolazione del latte in polvere seguano puntualmente le linee guida emanate dalla American Dietetic Association (ADA). Tali norme, al di là della raccomandazione di utilizzare preferenzialmente formulati pronti per il consumo (ready-to-feed), prescrivono l’osservanza di rigide misure di asepsi durante la preparazione e la refrigerazione a 2-3 °C del latte ricostituito per un periodo di tempo non superiore alle 4 ore. In particolare, viene sottolineata la necessità di disporre di locali separati per la preparazione, per la conservazione e la somministrazione del latte e di affidarne la preparazione a personale specificatamente qualificato e addestrato.

Come sottolineato in precedenza, infatti, un’impropria preparazione e conservazione del prodotto contaminato facilita la rapida crescita del microrganismo.

Varie indagini conseguenti ai numerosi episodi di malattia neonatale causati dall'*Ent. sakazakii*, presente nel latte in polvere, hanno permesso di stabilirne l'incidenza.

Una prima indagine avviata nei Paesi Bassi nel 1988 su 141 campioni di latte in polvere provenienti da 35 Paesi tra cui l'Italia, permise di isolare le *Enterobacteriaceae* nel 52,2% dei campioni; le specie più frequentemente riscontrate furono *Ent. agglomerans*, *Ent. cloacae*, *Ent. sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae*. *Ent. sakazakii* fu isolato dai campioni provenienti da Australia, Belgio, Canada, Danimarca, Francia, Germania, India, Paesi Bassi, Nuova Zelanda, Russia, Uruguay e USA. La carica delle *Enterobacteriaceae*, compreso *Ent. sakazakii*, non superava 1 UFC/g di prodotto analizzato (Muytjens *et al.*, 1988).

Nel 1997 un'indagine delle autorità canadesi rilevò che il 7% (8 confezioni positive) di 120 campioni di latte in polvere, prodotti da cinque diverse ditte, distribuiti in diversi supermercati, risultava contaminato (Nazarowec-Withe e Farber, 1997c).

Successivamente, nel 2002, la FDA (US Food and Drug Administration) rilevò che il 14% del latte in polvere presente sul mercato americano risultava contaminato da *Ent. sakazakii*.

Nello stesso anno, l'Agenzia Federale per la Sicurezza Alimentare del Belgio, in seguito al caso di meningite neonatale verificatosi nel marzo 2002 decise di ritirare dal commercio, come misura precauzionale, le confezioni sospettate di essere contaminate da *Ent. sakazakii*.

Indagini effettuate su campioni di latte in polvere per l'infanzia mostrano una percentuale di positività compresa tra l'1% e il 12%, con una carica contaminante molto bassa, compresa tra 0,36 UFC e 66,0 UFC per 100 grammi di prodotto (Nazarowec-Withe e Farber, 1997c).

I bassi livelli di contaminazione, generalmente, riscontrabili nel latte in polvere sono comunque considerati un fattore di rischio, data la capacità del microrganismo di moltiplicarsi nel prodotto ricostituito, come sopra indicato, entro breve tempo dalla preparazione, manipolazione prima del consumo, e conservazione a temperatura ambiente.

Dato che l'*Ent. sakazakii* non resiste alle temperature di pastorizzazione del latte e si ritrova facilmente nell'ambiente di lavoro, la contaminazione post-pastorizzazione, nonché la moltiplicazione durante la preparazione e la manipolazione prima del consumo del prodotto, rappresentano i punti critici cioè le fasi in cui si deve intervenire per prevenire e/o eliminare il rischio.

Criteri microbiologici di conformità

Proprio per prevenire i rischi microbiologici, da lunga data le imprese assicurano la conformità dei lotti a criteri microbiologici garantendo così la qualità delle partite di latte formulato commercializzate; negli ultimi anni, in particolare, per fronteggiare i rischi connessi alle contaminazioni microbiche, le industrie produttrici sono state obbligate ad adottare nuove modalità di controllo (il cosiddetto autocontrollo) basate sul sistema HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*).

In Italia i criteri microbiologici attualmente in vigore sono quelli previsti dall'OM dell'11 ottobre 1978 (Tabella 4) che stabilisce l'assenza dei coliformi/grammo di prodotto in 5 unità campionarie.

In Europa, la Commissione della UE sta elaborando un nuovo regolamento che fisserà i criteri microbiologici per gli alimenti. In questo documento è stato proposto un limite per le *Enterobacteriaceae* nel latte formulato in polvere pari a < 10 UFC/g in 5 unità campionarie.

Il *Codex Alimentarius* (organismo della WHO/FAO nato per proteggere la salute dei consumatori e coordinare l'elaborazione degli standard degli alimenti), invece, ritiene accettabile la presenza di 20 UFC di coliformi/grammo di prodotto in una delle 5 unità campionarie e l'assenza nelle rimanenti (CAC/RCP 21-1979).

Tabella 4. OM dell'11 ottobre 1978

Parametro microbiologico	Unità campionarie	Limiti di tolleranza
Carica microbica totale a 32 °C	5	10.000 UFC/g in tutte le unità campionarie
Coliformi	5	assenza in 1 g in tutte le unità campionarie
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	assenza in 1 g in tutte le unità campionarie
<i>Salmonella</i>	10	assenza in 25 g in tutte le unità campionarie

Metodi di analisi raccomandati

La ricerca di *Ent. sakazakii* nei liquidi biologici prevede generalmente l'utilizzo di sistemi automatizzati (es. Sistema MS-2 con software aggiornato per l'identificazione di batteri gram-negativi direttamente da colture ematiche) (Dipersio *et al.*, 1984); mentre nei campioni ambientali è prevista generalmente la ricerca del microrganismo nelle polveri (Kandhai *et al.*, 2004) (Appendice, Allegato 1).

La ricerca negli alimenti, invece, ha previsto, fino a poco tempo fa, solo l'uso degli stessi metodi impiegati per la ricerca/numerazione dei coliformi e/o dell'*Enterobacteriaceae*. Si tratta come è noto di metodi basati su una fase di arricchimento, una fase di isolamento mediante semina diretta su piastre di terreno selettivo e, infine, sulla tipizzazione. Il metodo, fino ad oggi più frequentemente utilizzato, è stato quello descritto dalla ISO 8523:1991 (Appendice, Allegato 2). Questo metodo, con opportune modifiche, è stato, nel maggio 2003, oggetto di un *Interlaboratory Trial* da parte del Laboratorio Comunitario di Riferimento per il Latte e i Derivati del Latte (Agenzia Francese di Sicurezza Sanitaria degli Alimenti), per stabilire se poteva essere impiegato per la ricerca diretta dell'*Ent. sakazakii* in campioni di latte in polvere per l'infanzia. Lo studio al quale ha partecipato anche il nostro Centro prevedeva le seguenti modifiche:

- *Fase di pre-arricchimento*
nella quale 25 g (anziché 1 g) di campione venivano posti in 225 mL (anziché in 10 mL) di acqua peptonata tamponata e incubati a 35-37 °C per 16-20 ore;
- *Fase di arricchimento selettivo*
in cui 10 mL (anziché 1 mL) del brodo di pre-arricchimento venivano seminati in 90 mL (anziché in 10 mL) di brodo di arricchimento selettivo e incubati a 35-37 °C per 24 ore;
- *Semina per striscio*
su piastre di agar nutritivo supplementato con 50 mg/L di α -MUG, dal brodo di arricchimento selettivo oltre quella sulla piastra di Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA). Le piastre venivano incubate a 25 °C in termostato per 24 h e a temperatura ambiente overnight al buio e osservate per la presenza di colonie tipiche che apparivano gialle alla luce normale e blu-violetto fluorescenti ai raggi ultravioletti. Questa caratteristica compariva quando l'*Ent. sakazakii* era presente in largo numero. L'aggiunta di α -MUG al terreno di coltura può, infatti, contribuire a fornire un valido screening per la differenziazione presuntiva dell'*Ent. sakazakii* dalle altre *Enterobacteriaceae*.

Recentemente è stato proposto dalla FDA (*Food and Drug Administration*) (Appendice, Allegato 3), un altro metodo che permette, a differenza del metodo ISO, di ricercare e numerare il microrganismo anche quando è presente a bassi livelli di carica. Si tratta di un metodo di numerazione mediante MPN (*Most Probable Number*) e prevede l'esame di almeno 333 g di prodotto (test del *three-tube*).

Infine, più recentemente sono stati proposti terreni selettivi cromogeni pronti all'uso (il ESSB/ESIA dalla ditta Biolife e il DFI dalla ditta Oxoid) per differenziare e numerare l'*Ent. sakazakii* dal latte e da altri alimenti.

In tutti i casi le colonie sospette vengono purificate e identificate per mezzo di test biochimici utilizzando i sistemi miniaturizzati API 20E (Bio-Merieux) o Microbact gram-negativi (Oxoid).

Accanto alla identificazione biochimica, si stanno affermando le tecniche di tipizzazione genotipica degli isolati. Tra queste, la *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (Appendice, Allegato 4), la *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) con l'utilizzo della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Appendice, Allegato 5) e la ribotipizzazione (Appendice, Allegato 6) sembrano avere un elevato potere discriminante. A tal proposito, si può utilizzare la tipizzazione biochimica come strumento di screening in seguito ad episodi di infezione da *Ent. sakazakii* ed entrambi i metodi di tipizzazione molecolare (RAPD e PFGE) per una più accurata caratterizzazione degli isolati.

Di recente, è stato sviluppato il sistema automatizzato BAX (Qualicon Dupont), che, impiegando la tecnologia PCR, permette una rapida identificazione di vari patogeni alimentari, tra cui *Ent. sakazakii*. Il metodo (Appendice, Allegato 7) prevede l'utilizzo di un kit che comprende provette da PCR in cui sono compattati i reagenti necessari alla reazione. L'analisi dei prodotti di reazione mediante la determinazione automatizzata della fluorescenza permette di effettuare l'operazione direttamente nella provetta di reazione evitando tutti i possibili rischi di contaminazione dovuti alla manipolazione del campione.

CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI

Enterobacter sakazakii è un patogeno emergente, spesso veicolato da latte in polvere e responsabile di una serie di infezioni, a volte con esito letale, prevalentemente in una particolare fascia di popolazione sopra indicata.

Oltre alla suscettibilità del paziente, i fattori che contribuiscono al rischio di infezione includono il livello di contaminazione dell'alimento, la termotolleranza del microrganismo, la velocità di crescita, la dose infettante e la virulenza del microrganismo.

Per i neonati, ridurre i rischi derivanti dall'*Ent. sakazakii* rappresenta, dunque, un preciso impegno per tutte le parti interessate; questo può essere raggiunto attraverso varie azioni combinate (ADA, 2003; Joint FAO/WHO, 2004):

- *a livello produttivo*
 - monitorare le materie prime, in particolare gli ingredienti che non necessitano di un ulteriore trattamento termico prima della miscelazione;
 - ridurre i livelli delle *Enterobacteriaceae* nell'ambiente di produzione;
 - incrementare la frequenza dei controlli negli ambienti di produzione e sul prodotto finito al fine di verificarne la conformità alla normativa nazionale e in caso di positività identificare le sorgenti di contaminazione mettendo in atto le più appropriate azioni correttive;
 - revisionare le istruzioni per la preparazione del latte suggerendo una temperatura dell'acqua di solubilizzazione più alta (> 70 °C);

- *a livello domestico*
 - adottare stringenti norme igieniche utilizzando contenitori puliti e disinfettati;
 - preparare solo la poppata necessaria per il pasto evitando di preparare in anticipo quelle dei pasti successivi o in caso di necessità limitare a 1-2 quelle preparate in anticipo;
 - evitare di lasciare a temperatura ambiente il latte ricostituito se non utilizzato;
 - assicurare il raffreddamento rapido del prodotto ricostituito e la sua conservazione in frigorifero;
 - limitare il più possibile l'intervallo di tempo tra la ricostituzione del prodotto e il suo consumo;

- *a livello ospedaliero/asili nido*
 - adottare buone pratiche di igiene nelle aree di preparazione;
 - predisporre linee guida riguardo la preparazione, manipolazione, conservazione e procedure di controllo del prodotto, accessibili al personale addetto;
 - disporre di una stanza adibita solamente alla preparazione, che sia separata dai reparti di degenza (negli ospedali), provvista di un'area per lo stoccaggio del prodotto e frequentata unicamente da personale autorizzato;
 - se la struttura manca di un'apposita stanza per la preparazione, predisporre comunque un'area da destinarsi unicamente a tale scopo;
 - disporre di utensili e attrezzature costruiti in modo tale da poter essere facilmente sanificati;
 - sottoporre a trattamento termico (esempio: lavaggio in lavastoviglie) o ad autoclavaggio tutti gli utensili adoperati per la preparazione;
 - utilizzare, quando possibile, utensili monouso;

- disporre di personale qualificato e specializzato (esempio: dietiste);
- assicurare il raffreddamento rapido del prodotto ricostituito e la sua conservazione in frigorifero;
- limitare il più possibile l'intervallo di tempo tra la ricostituzione del prodotto e il suo consumo;
- evitare di lasciare a temperatura ambiente il latte ricostituito se non utilizzato;
- richiudere opportunamente i contenitori dei latti non utilizzati completamente, riporli in frigorifero, apponendo sopra la data di scadenza;
- utilizzare, quando possibile, latte in forma liquida;
- applicare un corretto piano di autocontrollo che preveda la valutazione dei potenziali pericoli, l'identificazione dei punti critici di controllo (CCP), il monitoraggio dei punti critici di controllo, un piano per le non conformità e le azioni correttive necessarie, la verifica del sistema e la registrazione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott S. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter and Serratia. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM press; 1999. p.475-82.
- ADA American Dietetic Association. *Guidelines for preparation of formula and breastmilk in health care facilities. Pediatric practice group of the American Dietetic Association, 2003*. Disponibile all'indirizzo: http://www.eatright.org/Public/NutritionInformation/92_17242.cfm. Ultima consulenza 29/07/2004.
- Arseni A, Malamou-Ladas E, Koutsia C, Xanthou M, Trika E. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J Hosp Infect* 1987;9:143-50.
- Baker Robert D. Infant formula safety. *Pediatrics* 2002;110:833-35.
- Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr* 2001;90:356-58.
- Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsdottir O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* 1989;27:2054-56.
- Block C, Peleg O, Minster N, Bar-Oz B, Simhon A, Arad I, Shapiro M. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:613-16.
- Borneman R, Zerr DM, Heath J, Koehler J, Grandjean M, Pallipamu R, Duchin J. An outbreak of Salmonella serotype Saintpaul in a children's hospital. *Infect Contr Hospit Epidemiol* 2002;23:671-6.
- Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* 2003;95:967-73.
- Bruce J. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technol* 1996;50:77-81.
- Burgos J, Varela M. Multiple antibiotic resistant dairy soil bacteria. In: *102nd General Meeting of the American Society for Microbiology*. Salt Lake City (Utah), May 19-23, 2002. Session 25, Paper A-31.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella serotype Tennessee in powdered milk products and infant formula-Canada and the United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1993;42:116-17.
- CDSC Communicable Disease Surveillance Centre. Case of infant botulism in the United Kingdom. *Eurosurveillance Weekly* 2001;5(33).
- Clark NC, Hill BC, O'Hara CM, Steingrimsdottir O, Cooksey RC. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:467-72.
- Clementino MM, De Filippis I, Nascimento CR, Branquinho R, Rocha CL, Martins OB. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):3865-70.
- Dipersio JR, Ficorilli SM, Varga FJ. Direct identification and susceptibility testing of gram negative bacilli from BACTEC bottles by use of the MS-2 system with updated bacterial identification software. *J Clin Microbiol* 1984;20:1202-4.
- Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J Food Prot* 2004;67:60-3.
- European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. *Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on*

- Formulae (adopted on 4 April 2003)*. Bruxelles: European Commission; 2003. (SCF/CS/NUT/IF/65 Final).
- CAC (Codex Alimentarius Commission). *Risk profile of Enterobacter sakazakii in powdered infant formula*. Roma: Joint Office FAO/WHO; 2003. (Joint FAO/WHO Food Standard Programme – Codex Committee on Food Hygiene; CX/FH 03/13). Disponibile all'indirizzo: http://www.codexalimentarius.net/ccfh35/fh03_01e.htm. Ultima consultazione 8/09/2004.
- CAC (Codex Alimentarius Commission). *Risk profile of Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula*. Roma: Joint Office FAO/WHO; 2004. (Joint FAO/WHO Food Standard Programme – Codex Committee on Food Hygiene; CX/FH 04/12). Disponibile all'indirizzo: http://www.codexalimentarius.net/ccfh36/fh04_01e.htm. Ultima consultazione 8/09/2004.
- Joint FAO/WHO Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Geneva, 2-5 February 2004. *Advanced proof copy*.
- Farber JM. *Enterobacter sakazakii*- new foods for thought? *Lancet* 2004;363:5-6.
- Farmer III JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ, the Enterobacteriaceae Study group. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 1980;30:569-84.
- FDA (Food and Drug Administration). *Isolation and enumeration of Enterobacter sakazakii from dehydrated powdered infant formula*. College Park (Maryland): US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition; 2002.
- Forsyth JRL, Bennett N, Hogben S, Hutchinson EMS, Rouch G, Tan A, Taplin J. The year of the Salmonella seekers, 1977. *Australia and New Zealand Journal of Public Health* 2003;27(4):385-9.
- Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat M Nordmand P. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 2001;39(1):175-82.
- Hamilton JW, Lehane MJ Braig HR. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1355-56.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specification for Foods. Microbiological testing in food safety management. In: *Microorganisms in foods*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. vol. 7, cap. 8.
- ISO 8523. *Detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment*. Geneva: International Organization for Standardization; 1991.
- Ministero della Salute. Circolare 24 ottobre 2000, n. 16. Promozione a tutela dell'allattamento al seno. *Gazzetta Ufficiale- Serie Generale* n. 263, 10 novembre 2000.
- Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Sci and Technol* 2003;14:443-54.
- Iversen C, Lane M Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol* 2004, in press.
- Marth EH. Salmonellae and salmonellosis associated with milk and milk products. A review. *J Dairy Sci* 1969;52(3):283-315.
- Kandhai MC, Reij MW, Gorris LGM, Guillaume-Gentil O, Van Schothorst M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* 2004;363:39-40.
- Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect and Immun* 1998;66(2):645-9.
- Kleiman MB, Allen SD, Neal P, Reynolds J. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1981;14:352-4.

- Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:113-22.
- Muytjens HL, Van Der Ros-Van De Repe J, Van Druten HAM. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the a-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *J Clin Microbiol* 1984;20:684-6.
- Muytjens HL, Van Der Ros-Van De Repe J. Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1986;29:367-70.
- Muytjens HL, Roelofs-Willems H, Jaspar GHJ. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 1988;26:743-6.
- Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollee LA, Wachsmuth K Farmer III JJ. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol* 1983;18(1):115-20.
- Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol* 1997a;34:103-13.
- Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett Appl Microbiol* 1997b;24:9-13.
- Nazarowec-White M, Farber JM. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Food Prot* 1997c;60:226-30.
- Nazarowec-White, M Farber JM. Phenotypic and genotyping typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J Med Microbiol* 1999;48:559-67.
- Nazarowec-White M, Farber JM, Reij MW, Cordier JL, Van Schothorst M. *Enterobacter sakazakii*. In: Miliotis MD, Bier JW (Ed.). *International handbook of foodborne pathogens*. U.S.A.; 2003,p.407-13.
- No HK, Park NY, Lee SH, Hwang HJ Meyers SP. Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. *J Food Sci* 2002;67:1511-4.
- Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RT, Slutsker L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotype isolated from humans in the United States, 1987-1997. *J Infect Dis* 2002;183:753-61.
- Park JK, Seok WS, Choi BJ, Kim HM, Lim BK, Yoon SS, Kim S, Kim YS, Park JY. *Salmonella enterica* serovar London infections associated with consumption of infant formula. *Yonsei Med J* 2004;45(1):43-8.
- Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *J Food Prot* 2003;66:370-5.
- Rowe B, Begg NT, Hutchinson DN, Dawkins HC, Gilbert RJ, Jacob M, Hales BH, Rae FA, Jepson M. *Salmonella* ealing infections associated with consumption of infant dried milk. *Lancet* 1987;2:900-3.
- Simmons BP, Gelfad MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989;10:398-401.
- Stock I Wiedemann B Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clin Microbiol Infect* 2002;8(9):564-78.
- The DuPont Qualicon. *Bax System method for the detection of Enterobacter sakazakii in selected foods*. Disponibile all'indirizzo: http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_3/e_mflp-27.html. Ultima consultazione 10/03/2004.

- Threlfall EJ, Ward LR, Hampton MD, Ridley AM, Rowe B, Roberts D, Gilbert RJ, Van Someren P, WallPG, Grimont P. Molecular fingerprinting defines a strain of *Salmonella enterica* serotype Anatum responsible for an international outbreak associated with formula-dried milk. *Epidemiol Infect* 1998;121(2):289-93.
- Usera MA, Echeita A, Aladuena A, Blanco MC, Reymundo R, Prieto MI. Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella virchow*. *Europ J Epidemiol* 1996;12:377-81.
- Van Acker J, De Smet F, Muyltermans G, Bougateg A, Naessens A Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* 2001;39:293-7.
- Weir E. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *JAMC* 2002;166:1570.
- Zogay X, Bokranz W, Nimitz M Romlind U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect and Immun* 2003;71:4151-8.

APPENDICE
Metodi di analisi raccomandati

Vengono di seguito riportati alcuni dei metodi di analisi utilizzati per la determinazione e ricerca di *Ent. sakazakii*.

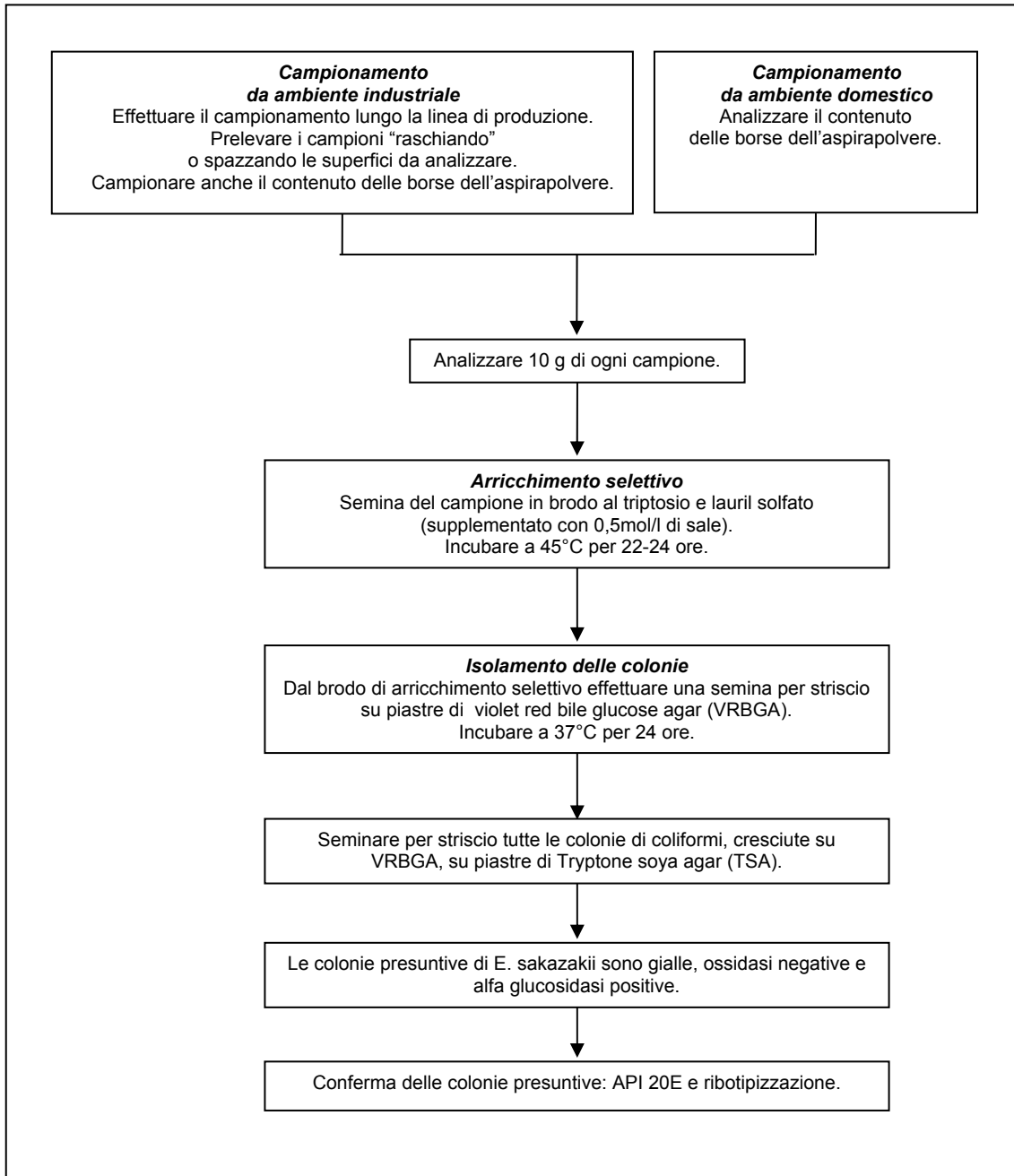
I metodi sono stati rielaborati e trasformati in diagrammi di flusso per una più semplice e immediata lettura. La bibliografia relativa ad ogni metodo è compresa nella bibliografia generale di questo rapporto.

I metodi sono presentati sottoforma di allegato nel seguente ordine:

- *Allegato 1*
Metodo per la ricerca di *Ent. sakazakii* in campioni ambientali
(Kandhai 2004)
- *Allegato 2*
Metodo ISO
(Norma ISO 8523:1991)
- *Allegato 3*
Metodo FDA
(FDA, 2002)
- *Allegato 4*
Metodo PFGE
(Nazarowek-White e Farber, 1999)
- *Allegato 5*
Metodo RAPD-PCR
(Clementino *et al.*, 2001)
- *Allegato 6*
Metodo ribotipizzazione
(Bruce, 1996)
- *Allegato 7*
Metodo BAX
(The Du Pont Qualicon, 2004)

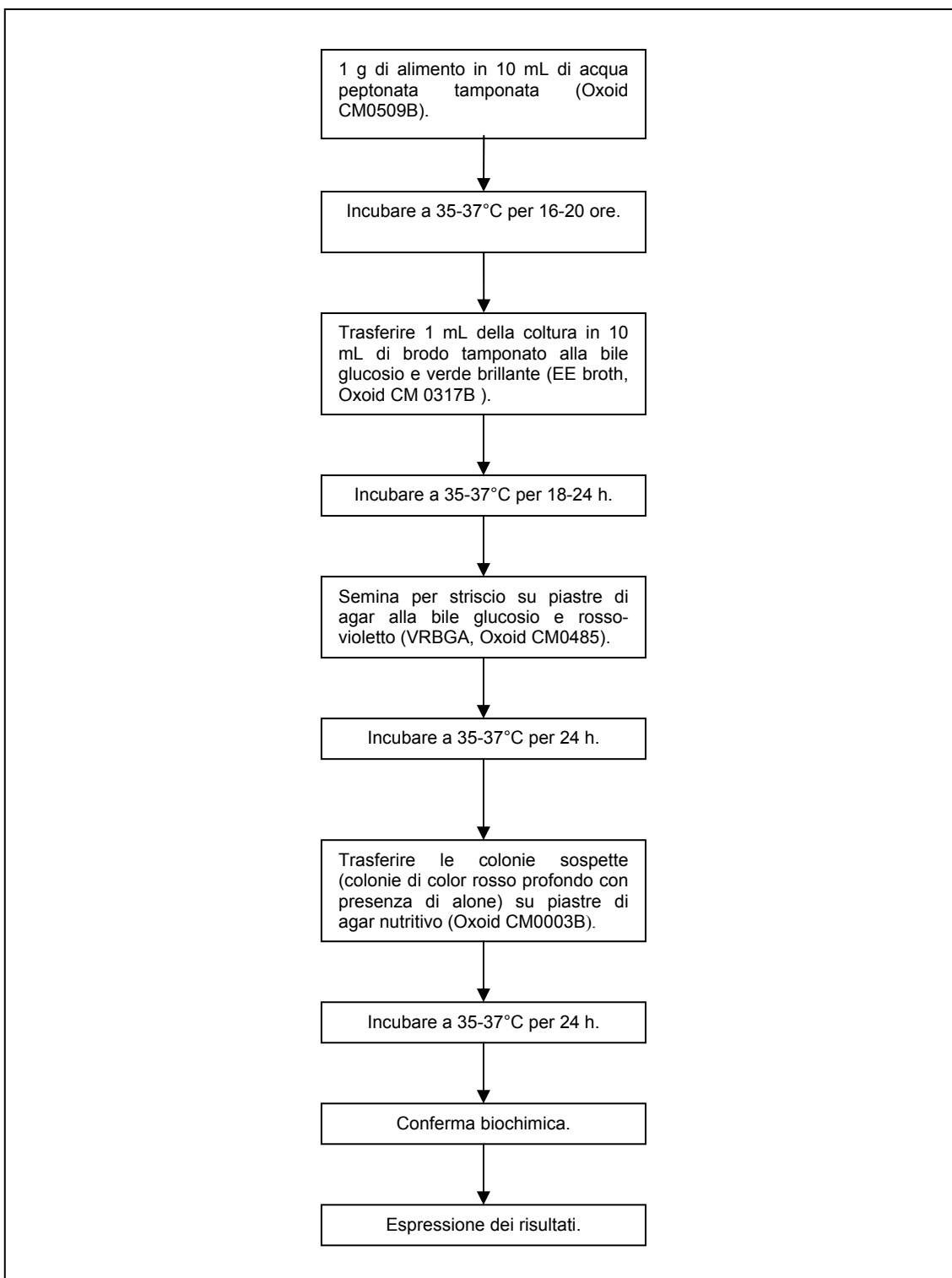
Allegato 1

Ricerca di *Ent. sakazakii* in campioni ambientali



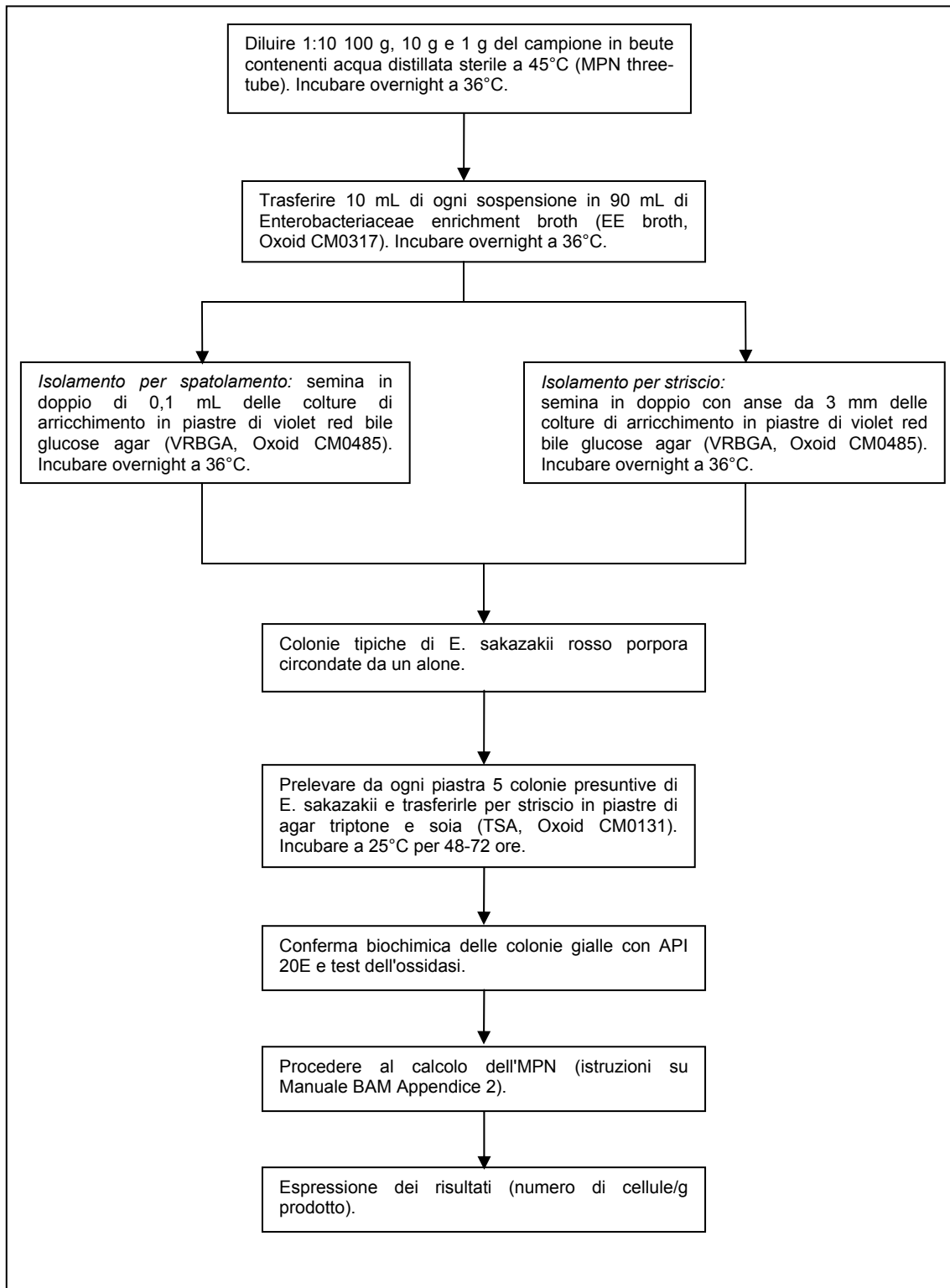
Allegato 2

Metodo ISO



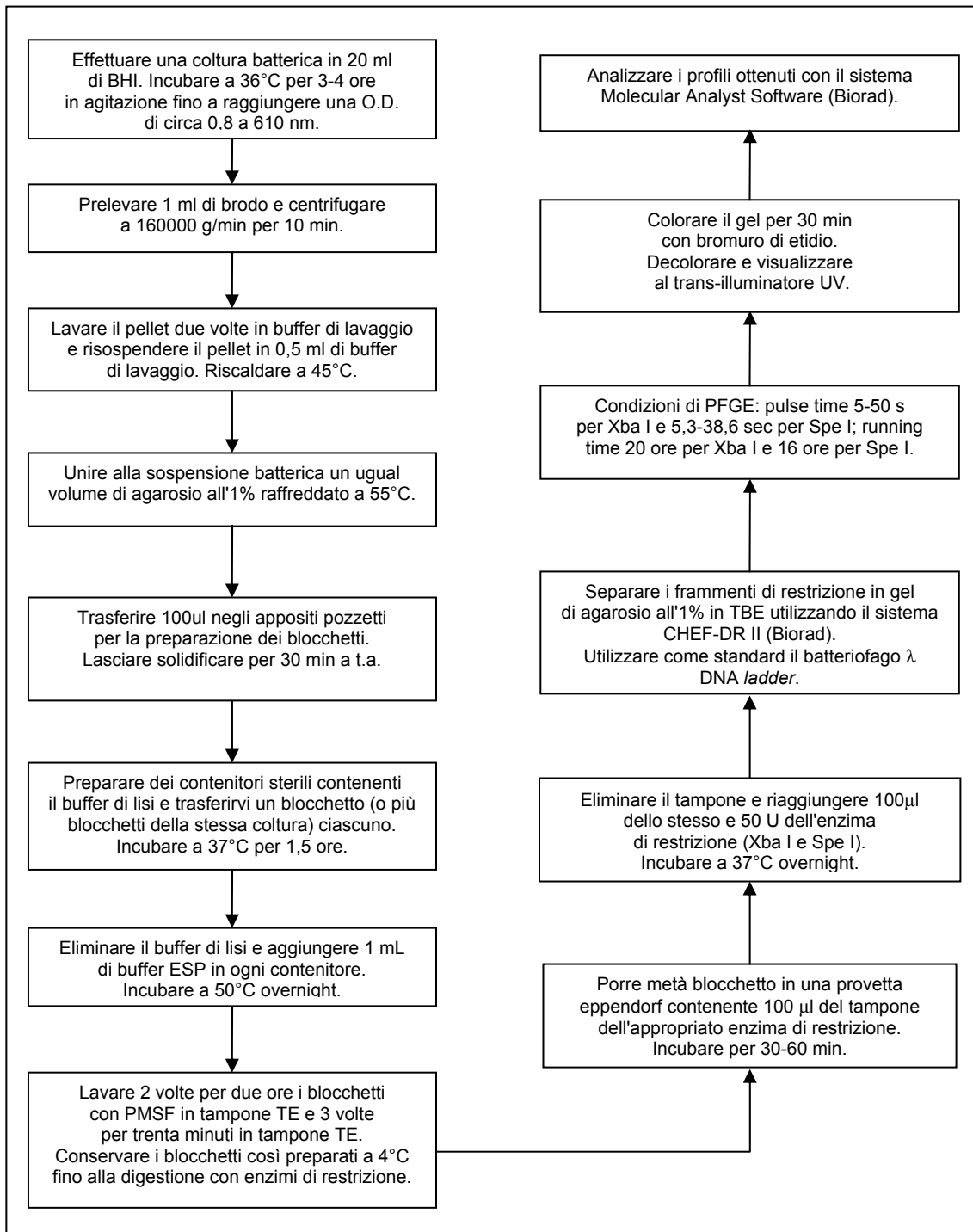
Allegato 3

Metodo FDA



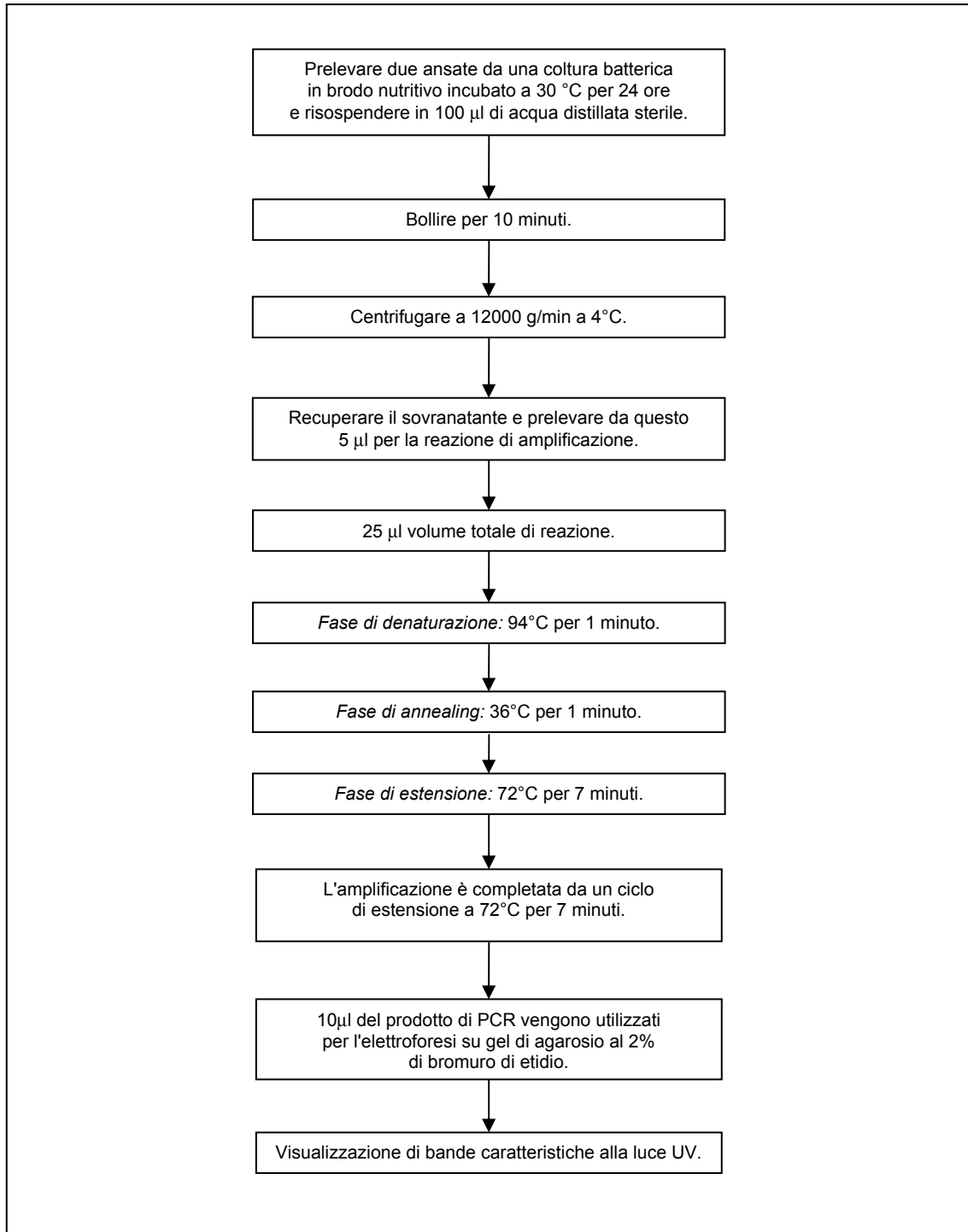
Allegato 4

PFGE



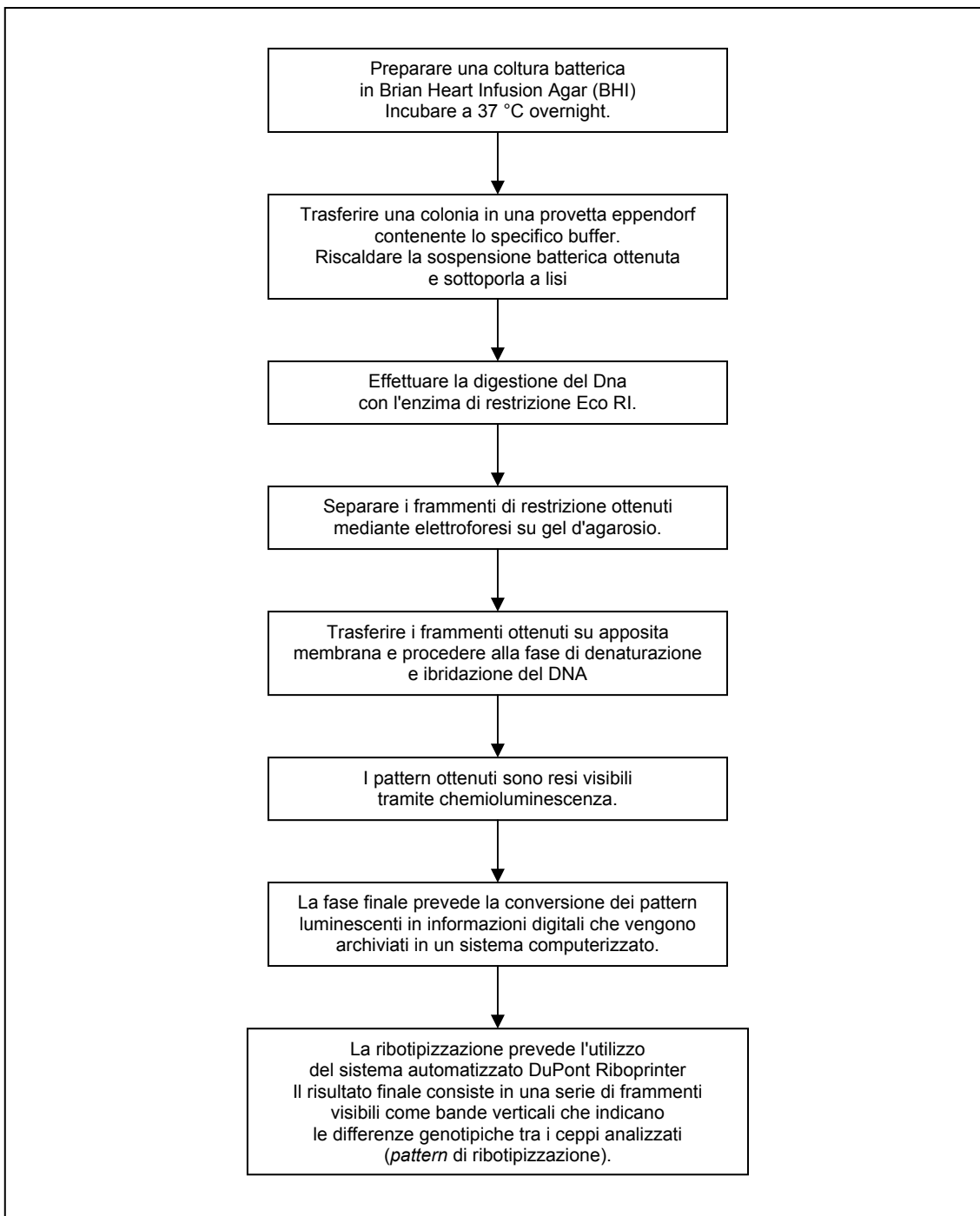
Allegato 5

RAPD-PCR



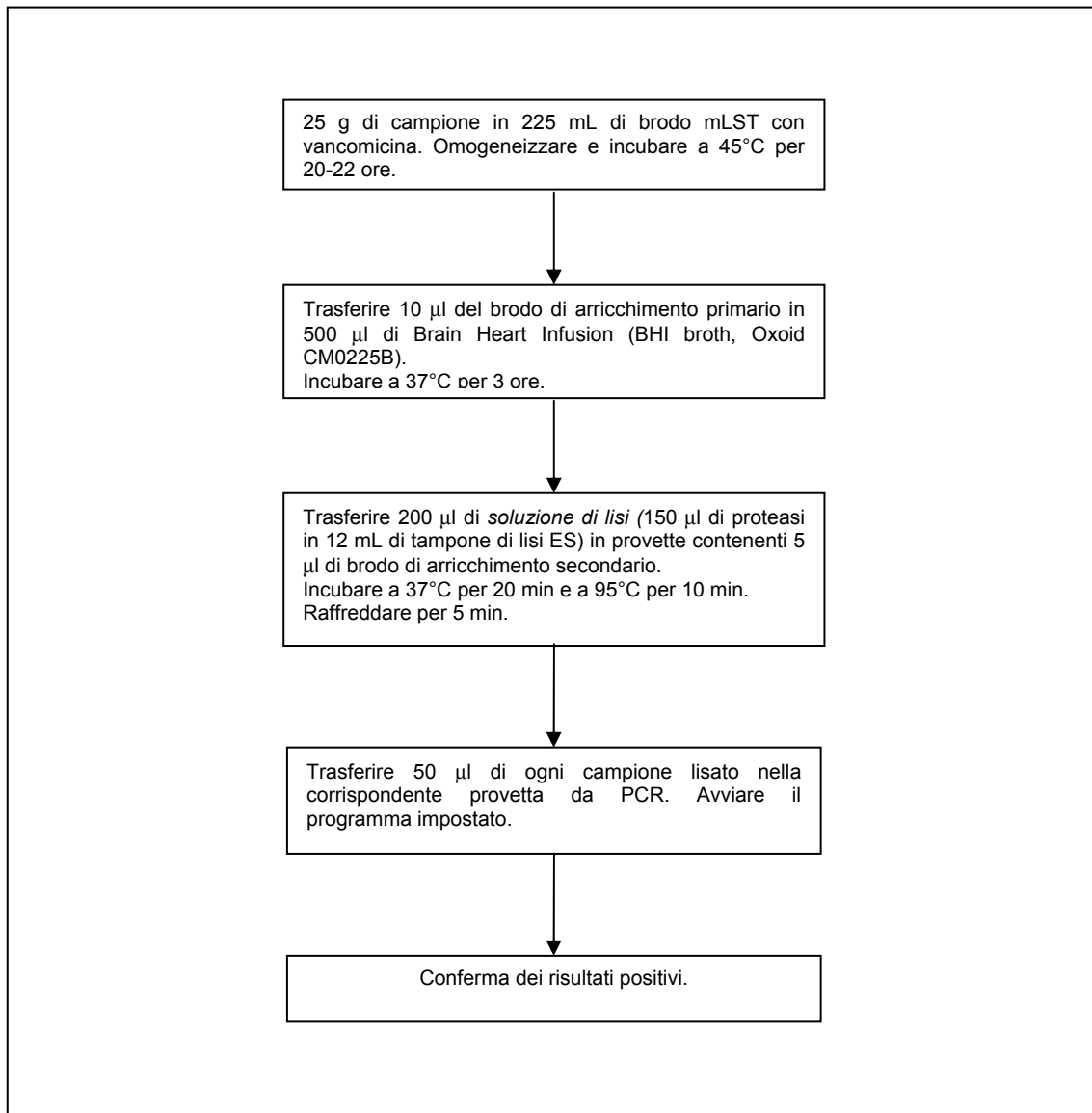
Allegato 6

Ribotipizzazione



Allegato 7

Metodo BAX



*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, settembre 2004 (n. 2) 1° Suppl.