

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

IV Workshop nazionale Enter-net Italia
Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche

**Diagnostica ed epidemiologia
delle zoonosi trasmesse da alimenti**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 25-26 novembre 2004

RIASSUNTI

A cura di

Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (b) e Susanna Lana (c)

(a) Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale

(b) Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate

(c) Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
04/C4

Istituto Superiore di Sanità

IV Workshop Nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche. Diagnostica ed epidemiologia delle zoonosi trasmesse da alimenti. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 25-26 novembre 2004. Riassunti.

A cura di Alfredo Caprioli, Ida Luzzi e Susanna Lana
2004, v, 112 p. ISTISAN Congressi 04/C4 (in italiano e inglese)

Enter-net è una rete europea per la sorveglianza delle infezioni enteriche che effettua il monitoraggio delle infezioni da salmonella, *E. coli* O157 ed altri VTEC. Gli obiettivi sono l'armonizzazione dei metodi di tipizzazione, il mantenimento di database aggiornati, l'identificazione e il controllo degli episodi epidemici, il monitoraggio del fenomeno della antibiotico-resistenza nei ceppi batterici isolati. L'Italia è rappresentata nel progetto dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che coordina un sistema di sorveglianza nazionale che coinvolge numerosi laboratori del Servizio Sanitario Nazionale operanti nei settori umano, veterinario e ambientale. Dal 2001, le attività di Enter-net Italia vengono presentate nel corso di un workshop che quest'anno oltre a presentare le attività del Sistema di sorveglianza, fornirà un aggiornamento delle attività svolte nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata "Zoonosi trasmesse da alimenti: applicazione e armonizzazione di metodiche innovative per lo studio in ambito medico e veterinario" approvato dal Ministero della Salute e finanziato dal Fondo Sanitario Nazionale.

Parole chiave: Infezioni enteriche, Sorveglianza, Zoonosi

Istituto Superiore di Sanità

IV National workshop Enter-net Italia. Surveillance system of enteric infections. Diagnosis and epidemiology of foodborne zoonoses. Istituto Superiore di Sanità. Rome, November 25-26, 2004. Abstract book.

Edited by Alfredo Caprioli, Ida Luzzi and Susanna Lana
2004, v, 112 p. ISTISAN Congressi 04/C4 (in Italian and English)

Enter-net is an international network for the surveillance of human gastrointestinal infections, which monitors salmonellosis and Verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) O157, including their antimicrobial resistance. Main objectives of Enter-net are the harmonisation of typing methods, the establishment of a regularly updated international database including the antimicrobial susceptibility of the isolates, the recognition and investigation of outbreaks. The Istituto Superiore di Sanità (ISS) represents Italy in the network and coordinates a national surveillance system that involves laboratories operating in the medical, veterinary and environmental fields. Since 2001, Enter-net Italia activities are presented in an annual workshop. This year the workshop is structured as a meeting that, beside presenting Enter-net activities, will provide an updating of the research project "Foodborne zoonoses: harmonization and application of innovative methods in the medical and veterinary fields". The project is funded by the Italian Ministry of Health.

Key words: Enteric infections, Surveillance, Zoonoses

Per informazioni su questo documento scrivere a: luzzi@iss.it, a.caprio@iss.it

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

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

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2004 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	v
Relazioni	1
Comunicazioni orali e poster	15
Prima sessione	
Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche Enter-net Italia: presentazione delle attività 2003-2004 (prima e seconda parte)	17
Seconda sessione	
Sanità Pubblica Veterinaria.....	33
Terza sessione	
Infezioni batteriche e antibiotico-resistenza.....	53
Quarta sessione	
Infezioni virali e parassitarie.....	91
Indice degli autori	109

PROGRAMMA

Giovedì 25 novembre 2004

- 14.30 Registrazione dei partecipanti
- 15.00 Indirizzo di benvenuto e introduzione
Antonio Cassone, Alfredo Caprioli

Prima sessione

SISTEMA DI SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI ENTERICHE ENTER-NET ITALIA: PRESENTAZIONE DELLE ATTIVITÀ 2003-2004

Parte prima

Moderatori: Alfredo Caprioli, Stefania Salmaso

- 15.15 *Le infezioni da Salmonella in Italia*
Ida Luzzi
- 15.35 *Sorveglianza delle salmonellosi nelle popolazioni animali*
Antonia Ricci
- 15.50 *Emerging antibiotic-resistant salmonellae in the US*
Jean Whichard
- 16.05 *S.Napoli in Lombardia: lavori epidemiologici in corso per un sierotipo emergente*
Mirella Pontello
- 16.20 Intervallo

Parte seconda

Moderatori: Ida Luzzi, Caterina Mammina

- 16.45 *Tipizzazione di Salmonella Typhimurium: stima della frazione di casi umani attribuibile a una data fonte animale*
Luca Busani
- 17.00 *Sorveglianza della sindrome emolitico-uremica in Italia*
Alberto E. Tozzi
- 17.15 **Comunicazioni orali**
- 17.35 Discussione

Venerdì 26 novembre 2004

**Seconda sessione
SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA**

Moderatori: Giorgio Battelli, Ugo Santucci

9.00 *Strategie di controllo delle zoonosi nell'Unione Europea*
Stefano Marangon

9.20 *Strategie di controllo delle malattie da Prioni*
Umberto Agrimi

9.40 Discussione

9.50 **Comunicazioni orali**

10.45 Intervallo

**Terza sessione
INFEZIONI BATTERICHE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA**

Moderatori: Achille Franchini, Annalisa Pantosti

11.15 *Epidemiologia molecolare di Ent. faecium vancomincino-resistente
relazione genetica tra ceppi di origine umana e animale*
Roberta Fontana, Maria Grazia Bonora

11.40 *Recenti acquisizioni su Listeria monocytogenes*
Paolo Aureli

12.00 Discussione

12.10 **Comunicazioni orali**

13.00 Intervallo

**Quarta sessione
INFEZIONI VIRALI E PARASSITARIE**

Moderatori: Francesco M. Cancellotti, Antonino Nastasi

14.30 *Epidemiologia molecolare dell'epatite virale di tipo E in Italia*
Luisa Romanò, Alessandro Zanetti

14.50 *Ruolo dell'acqua e degli alimenti nella trasmissione dei protozoi Cryptosporidium
e Giardia*
Simone M. Cacciò

15.10 Discussione

15.20 **Comunicazioni orali**

16.00 Fine dei lavori

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

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

I lavori sono divisi in due sezioni:

- *Relazioni*
Contiene gli abstract secondo l'ordine previsto nel programma.
- *Comunicazioni orali e poster*
È strutturata in base alle corrispondenti sessioni del programma. I lavori sono presentati in ordine alfabetico del primo autore; i poster sono contrassegnati con la lettera P.

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

RELAZIONI

LE INFEZIONI DA SALMONELLA IN ITALIA

Ida Luzzi, Anna Maria Dionisi, Emma Filetici, Sergio Arena, Ildo Benedetti, Slawomir Owczarek, Concetta Scalfaro, Pasquale Galetta, Antonino Bella, Susanna Lana, Luca Busani, Caterina Graziani, Stefania Salmaso
Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Enter-net è la rete europea di sorveglianza delle infezioni enteriche che effettua il monitoraggio delle infezioni da Salmonella, *E. coli* O157 e altri *E. coli* produttori di verocitotossina. La rete è attiva dal 1994, coinvolge tutti i Paesi della Unione Europea ed è coordinata dall'HPA di Colindale. La rete nazionale Enter-net Italia, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità, si avvale della partecipazione di laboratori diagnostici che operano nel settore di microbiologia clinica, veterinaria e ambientale. Nell'ambito del sistema di sorveglianza Enter-net Italia vengono raccolti ogni anno dati riguardanti circa 6.000 isolamenti di Salmonella da fonte umana e altrettanti da fonte non umana (animali, alimenti, ambiente). Negli anni 2001 2002 e 2003 il sierotipo isolato più frequentemente dall'uomo è stato *S. Typhimurium* dopo che per tutti gli anni 90 il sierotipo più frequente era stato *S. Enteritidis*. Nel periodo tra il 2000 e il 2002 la percentuale di casi umani da *S. Enteritidis* è gradatamente diminuita dal 40-50% osservato costantemente negli anni 90, al 25%, per poi aumentare di nuovo nel corso del 2003 fino al 38%. Sempre nel 2003 si è osservata un diminuzione dei sierotipi *S. Infantis* e *Derby* e un aumento dei ceppi appartenenti al sierotipo non ancora denominato, 1,4,5,12:i:-.

Anche in Italia, come nel resto dei Paesi che partecipano a Enter-net, si è osservata negli anni una progressiva diminuzione della diffusione del fagotipo PT4 di *S. Enteritidis*: dal 70% negli anni 80 a poco più del 30% negli ultimi due anni in Italia. Per quanto riguarda *S. Typhimurium* il fagotipo DT104 resta il più frequente ma è da segnalare che in Italia negli ultimi anni si sta osservando un progressivo aumento di isolamento di ceppi non tipizzabili (25% dei ceppi umani, 43% dei ceppi isolati da suino nel 2003) che presentano un caratteristico pattern di resistenza agli antibiotici: Ampicillina, Streptomina, Sulfonamide, Tetraciclina.

I dati relativi alla distribuzione dei sierotipi, dei fagotipi, della multiresistenza nonché la caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati in Italia vengono periodicamente inviati e analizzati insieme a quelli degli altri Paesi europei per l'identificazione di episodi epidemici internazionali e per lo studio dell'epidemiologia generale di queste infezioni.

A livello nazionale, per facilitare questi compiti, è necessario aumentare la rapidità di segnalazione dei casi e la rappresentatività di tutto il territorio.

SORVEGLIANZA DELLE SALMONELLOSI NELLE POPOLAZIONI ANIMALI

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

(a) Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, (b) Centro Regionale di
Epidemiologia Veterinaria - IZS delle Venezie, (c) IZS del Piemonte, Liguria, Valle
d'Aosta, (d) IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, (e) IZS dell'Umbria e delle
Marche, (f) IZS del Lazio e della Toscana, (g) IZS dell'Abruzzo e del Molise, (h) IZS del
Mezzogiorno, (i) IZS della Puglia e Basilicata, (l) IZS della Sicilia, (m) IZS della Sardegna

L'importanza del controllo delle malattie a trasmissione alimentare, e delle infezioni da Salmonella in particolare, a livello di produzione primaria, è stata recentemente ribadita dalla nuova normativa europea sulle zoonosi (Direttiva 2003/99 e Regolamento 2160/2003), che identifica nel controllo di filiera lo strumento cardine per la prevenzione di queste patologie nell'uomo. Un'importante novità in questo ambito è rappresentata dal fatto che da queste norme viene previsto il monitoraggio e il controllo negli animali dei sierotipi di Salmonella prevalenti nell'uomo, il che determinerà la necessità di un continuo aggiornamento dei sistemi di sorveglianza, nell'uomo e negli animali, per poter far fronte tempestivamente alle variazioni epidemiologiche. Attualmente, sulla base dei dati comunitari relativi ai sierotipi prevalenti nell'uomo, è stato definito che i piani di sorveglianza negli animali debbano riguardare *S. Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Hadar* e *Virchow*. Nel nostro Paese è attivo dal 2002 il sistema Enter-vet, relativo alla sorveglianza di laboratorio delle infezioni da Salmonella di pertinenza veterinaria, e a cui partecipano tutti gli Istituti Zooprofilattici con il coordinamento del Centro di Referenza. Nel corso del 2003 sono stati notificati i dati relativi a 4379 ceppi tipizzati. Il sierotipo più frequentemente isolato risulta essere *S. Typhimurium* con una frequenza pari al 21,40% (22,68% nel 2002). Di particolare rilievo è l'aumento degli isolamenti di *S. Enteritidis* e del sierotipo, non ancora denominato, 1,4,5,12:i-. L'aumentato isolamento di *S. Enteritidis* è da ascrivere soprattutto alle specie avicole, e al pollo in particolare, in cui questo sierotipo appare attualmente quello prevalente (11,6%). È interessante inoltre notare come si sia drasticamente modificato il quadro relativo ai fagotipi isolati, con un notevole aumento di PT 14B, 21 e 1 a fronte di una contrazione negli isolamenti di PT 4. Per quanto riguarda il sierotipo 1,4,5,12:i-, nel 2003 è risultato essere il terzo sierotipo isolato da campioni di origine suina; si tratta di un ceppo isolato per la prima volta in Spagna nel 1997, caratterizzato da resistenza multipla agli antibiotici, e che appare emergente anche nel nostro Paese, essendo isolato con crescente frequenza sia da campioni di origine umana che di origine veterinaria. Tale stipite viene facilmente identificato attraverso la sierotipizzazione, con conferma dell'assenza della seconda fase ciliare (H 1,2) attraverso una metodica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multiplex. Da notare infine il notevole aumento dei ceppi di *S. Typhimurium* che risultano non fagotipizzabili (NT), che rappresentano il tipo prevalente di *Typhimurium* nel 2003, e addirittura il 44% degli isolati di origine suina.

S. NAPOLI IN LOMBARDIA: LAVORI EPIDEMIOLOGICI IN CORSO PER UN SIEROTIPO EMERGENTE

Maria Gramegna (a), Anna Pavan (a), Luigi Macchi (a), Gabriele Fontana (b), Maria Agnese Ulissi (c), Maria Teresa Pilla (d), Luca Busani (e), Mirella Pontello (b)
(a) UO Prevenzione Direzione Generale Sanità Regione Lombardia, Milano; (b) Istituto di Igiene, Università degli Studi di Milano; (c) ASL Varese; (d) ASL Parabiago; (e) Istituto Superiore di Sanità, Roma

La ri-emergenza di *Salmonella enterica* subsp *enterica* sierotipo *Napoli* a partire dall'anno 2000 in Lombardia – e in particolare nella provincia di Varese – è già stata evidenziata nel corso del workshop di Enter-net 2003: l'insorgenza dei casi era di tipo stagionale (mesi estivi) e riguardava prevalentemente bambini di età inferiore ai 5 anni. Non essendo stati raccolti elementi che potessero chiarire la catena di contagio (fonti e veicoli), con la collaborazione della Regione Lombardia e delle Aziende Sanitarie Locali lombarde è stato avviato uno studio specifico. L'indagine, ad oggi non ancora conclusa, è stata così strutturata:

1. incrocio per il periodo 2000-2003 dei dati raccolti attraverso Enter-net con quelli derivanti dal Sistema Informativo delle Malattie Infettive della Lombardia (SIMIL);
2. raccolta e analisi delle inchieste epidemiologiche disponibili, eseguite per i casi di accertata infezione da *S. Napoli*, con particolare attenzione alle esposizioni ambientali riferite;
3. predisposizione e utilizzo (a partire dall'agosto 2004) di un questionario di inchiesta supplementare per indagare le ipotesi di trasmissione non alimentare.

L'obiettivo principale è stato quello di indagare la tipologia dei fattori alimentari e non alimentari associati alla comparsa delle infezioni da *S. Napoli*, ma attraverso lo studio è stato anche possibile procedere ad una iniziale valutazione delle attività di sorveglianza e individuare la possibilità di una maggiore sinergia tra il sistema di notifica e la rete Enter-net.

Nel periodo 2000-2003, attraverso la rete Enter-net, sono stati individuati 104 isolamenti di *S. Napoli*; di questi 54 risultavano notificati anche in SIMIL; viceversa in SIMIL sono stati individuati 8 casi non riportati da Enter-net. Le differenze tra le due banche dati sono da una parte riconducibili ai criteri di notifica (SIMIL diversamente da Enter-net raccoglie solo i casi sintomatici) e dall'altra al fatto che non tutti i laboratori che effettuano la tipizzazione partecipano alla rete. I due archivi sono risultati scarsamente sovrapponibili e, pur riconoscendo che – data la natura stessa dei dati che vengono catturati dalle due fonti – una perfetta corrispondenza non è ipotizzabile, l'integrazione dei due sistemi può essere molto utile e anche perfezionabile (ridurre ed eliminare le incompletezze, rendere agile e tempestivo il lavoro di incrocio). In totale sono state recuperate 51 inchieste epidemiologiche: si conferma sia la concentrazione dei casi nella fascia di età 0-5 anni, sia la distribuzione geografica (epicentro nella provincia di Varese). Per quanto attiene le modalità di contagio, l'analisi dei dati è tuttora in corso; si può solo osservare che non emergono chiare associazioni con veicoli alimentari, ma piuttosto è riferita l'esposizione al contatto con animali, la residenza in ambienti rurali o attività ricreative all'aperto.

TIPIZZAZIONE DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*: STIMA DELLA FRAZIONE DI CASI UMANI ATTRIBUIBILE A UNA DATA FONTE ANIMALE

Luca Busani (a), Caterina Graziani (a), Antonia Ricci (b), Ida Luzzi (a)

(a) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*

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

S. Typhimurium (STM) è il principale sierotipo isolato da casi umani in Italia dal 2001, causando circa il 40% delle infezioni. Esso è inoltre diffuso nelle varie specie animali (54% degli isolati da suino, 66% da bovino, 5% da pollame, 13% da tacchino) e nell'ambiente (17%), che agiscono da serbatoio e fonte di infezione. La notevole diffusione di STM rende difficile tracciare l'origine dei casi umani solo col sierotipo; diviene quindi fondamentale l'applicazione di altre metodiche di tipizzazione per avere indicazioni sulla fonte degli isolati. I dati raccolti dalla rete Enter-net ed Enter-vet in Italia nel 2002-2003, su fagotipizzazione, resistenza agli antibiotici e profili di PFGE di isolati di STM da casi umani, da suini, da bovini, da pollame e da tacchini sono stati comparati. Isolati di STM non tipizzabili col panel di fagi in uso (DT NT) sono stati osservati con frequenza crescente e rappresentano il 26% degli isolati umani, il 20% di quelli suini e meno del 5% di quelli da altre specie. Il profilo di PFGE dei ceppi DT NT ha mostrato che quasi tutti i ceppi suini hanno lo stesso profilo (XB0079), osservato anche nel 78% degli isolati umani, ma quasi assente negli isolati da altre specie. La resistenza ad ampicillina (A), streptomina (S), sulfonamidi (Su), tetracicline (Te), talvolta associata alla resistenza all'acido nalidixico (Na) e al trimetoprim (Tmp) ma senza la resistenza al cloramfenicolo (C), è stata osservata nel 91% degli isolati con profilo XB0079 mentre le stesse resistenze si sono osservate solo nel 40% dei ceppi di STM DT NT con altri profili PFGE.

Questi risultati indicano che gli isolati umani di STM con fagotipo NT e profilo di resistenza ASSuT sono molto probabilmente di origine suina. Inserendo queste informazioni in un modello matematico che combina tra loro dati di fagotipizzazione, dati sulla resistenza agli antibiotici, sui profili di multiresistenza e sui profili di PFGE si è potuto stimare che circa il 40% di infezioni umane causate da STM ASSuT, con resistenza al Tmp sono di origine suina. L'uso di *marker* di antibiotico-resistenza in combinazione tra di loro e con altri *marker* (fagotipo, PFGE) ha consentito di tracciare la fonte dei casi umani e di definire il contributo dell'allevamento suino alla totalità delle infezioni umane da STM. I dati ottenuti vanno però confermati con l'analisi di dati epidemiologici sui principali fattori di rischio di infezione da Salmonella nell'uomo.

SORVEGLIANZA DELLA SINDROME EMOLITICO-UREMICA IN ITALIA

Alberto E. Tozzi (a), Gianfranco Rizzoni (a), Maria Antonietta Procaccino (a),
Fabio Minelli (b), Maria Luisa Marziano (b), Gaia Scavia (b),
Maurizio Brigotti (c), Alfredo Caprioli (b)

(a) Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma

(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Bologna

La Sindrome Emolitico Uremica (SEU) è la più comune causa di insufficienza renale acuta in età pediatrica. Nella stragrande maggioranza dei casi è la più grave complicanza delle infezioni da *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC). Tipicamente il paziente, dopo il contagio, ha un episodio di diarrea, spesso mucoematica, della durata di qualche giorno. Successivamente compaiono i segni caratteristici della sindrome: anemia emolitica, piastrinopenia, e insufficienza renale.

La sorveglianza della SEU è da molti anni un esempio di azione integrata tra attività clinica presso i reparti di nefrologia pediatrica italiani e coordinata dall'Ospedale Bambino Gesù di Roma, e le attività microbiologiche speciali per il riconoscimento delle infezioni da che vengono eseguite presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Dal 1/5/1988 al 31/7/2004 sono stati segnalati al Registro 429 casi di SEU in età pediatrica, di cui il 48,3% femmine. L'incidenza media della SEU è stata di 0,3/100.000 per anno, un valore 2-3 volte inferiore a quelli riportati in altri paesi europei. Tuttavia, un'analisi della localizzazione geografica dei casi ha messo in evidenza marcate differenze tra regionali, con un trend generalmente decrescente dal Nord al Sud Italia.

Il 77% dei bambini ha presentato un episodio di diarrea prima dell'esordio della SEU, e, tra di essi, il 66% aveva diarrea mucoematica. Il 28% dei casi aveva soggiornato fuori casa per almeno una notte nella settimana precedente l'insorgenza della SEU, il 24% ha dichiarato di avere osservato un aumento degli episodi di diarrea nella scuola frequentata dal bambino, e il 7% di aver notato un aumento dei casi di diarrea tra i conoscenti.

Il 73% dei pazienti ha mostrato evidenza di infezione da STEC, identificata mediante la combinazione di vari metodi di laboratorio. L'esame delle feci è risultato positivo nel 29% dei pazienti. In particolare il 28% dei campioni era positivo per presenza di verocitotossina libera, e l'8% per l'isolamento di un ceppo VTEC. L'esame degli anticorpi anti LPS è risultato positivo nel 61% dei pazienti. In totale il 32% dei pazienti è risultato positivo ad infezione da STEC O157, il 15% ad O26, e il 7% ad O111.

La sorveglianza della SEU in Italia conferma la bassa incidenza della malattia in Italia in confronto ad altri paesi Europei. L'Italia non ha sperimentato eventi epidemici negli ultimi 10 anni. A fronte di questi elementi, e dell'assenza di chiari fattori di rischio nella popolazione pediatrica italiana, è da notare l'emergenza e la frequenza di sierotipi diversi da O157. La sorveglianza della SEU rimane uno strumento importante per valutare variazioni dell'epidemiologia delle infezioni da VTEC in Italia come in altri paesi esteri.

STRATEGIE DI CONTROLLO DELLE ZONOSI NELL'UNIONE EUROPEA

Stefano Marangon, Antonia Ricci
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

La normativa sul controllo delle malattie a trasmissione alimentare ha subito, negli ultimi anni, dei cambiamenti radicali, a partire dal Libro Bianco e dal Regolamento 178/2002 fino alla recente emanazione della Direttiva 2003/99 e del Regolamento 2160/2003. Tali norme nascono dalla necessità di dare un segnale nuovo in questo settore, con l'intento di riacquisire da parte degli organi ufficialmente preposti alla tutela della salute pubblica la fiducia dei consumatori, seriamente compromessa a seguito delle crisi alimentari che hanno contraddistinto la fine del secolo scorso (BSE, diossina, ecc.). Tali norme danno al consumatore un ruolo centrale nel "sistema sicurezza", sia come figura da tutelare che come destinataria di tutte le informazioni relative alle problematiche alimentari, e individuano la necessità, per coloro che si trovino a gestire i rischi alimentari, di avere a disposizione dati scientifici certi, che permettano di quantificare il rischio per la popolazione e di valutare l'impatto di eventuali misure di controllo. Tale obiettivo può essere raggiunto attraverso l'applicazione della metodologia dell'Analisi del Rischio, che dovrà rappresentare, in una prospettiva a medio termine, lo strumento di riferimento per l'individuazione delle priorità sanitarie di un paese; ad essa saranno legate le scelte di alcuni parametri fondamentali per le decisioni da prendere per rendere efficiente ed efficace il controllo degli alimenti.

Un altro caposaldo della nuova normativa è il controllo di filiera, che vede la fase di allevamento come momento critico di diffusione della contaminazione e quindi come punto cardine delle attività di controllo. La Direttiva 2003/1999 e il Regolamento 2160/2003 prescrivono infatti il monitoraggio e il controllo delle malattie alimentari a livello di produzione primaria, con lo scopo di ridurre il rischio per l'uomo, secondo il principio *safe food from safe animals*.

Ai Paesi Membri viene richiesto di mettere in atto piani di monitoraggio mirati alla definizione della situazione sanitaria delle popolazioni animali, allo scopo di stabilire successivamente degli specifici obiettivi di riduzione della prevalenza di infezione per i patogeni prevalenti nell'uomo, creando quindi una fortissima necessità di collegamento fra i sistemi di sorveglianza attivi in campo umano e in campo veterinario.

Infine, grande importanza viene data alla responsabilità dei produttori come garanti della salubrità delle produzioni, ad un approccio comunque basato sull'analisi costo/beneficio, all'espletamento delle indagini sui focolai di tossinfezione alimentare, allo scambio di informazioni fra Autorità competenti.

STRATEGIE DI CONTROLLO DELLE MALATTIE DA PRIONI

Umberto Agrimi
Istituto Superiore di Sanità, Roma

La “crisi BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)” ha rappresentato un evento catastrofico per la zootecnia e un problema di sanità pubblica veterinaria senza precedenti nell’Unione Europea (UE). Nonostante siano trascorsi quasi 20 anni dai primi casi, il controllo della malattia continua a richiedere un grande impegno di risorse umane ed economiche.

Le ragioni profonde della crisi sono da attribuire alle scarse conoscenze sulla nuova malattia – ma più in generale sull’intero gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) – e ai limiti delle strategie di profilassi e controllo disponibili. Purtroppo, molti interrogativi restano ancora aperti e l’atteggiamento di cautela delle Autorità sanitarie dell’UE comprende oggi anche le EST dei piccoli ruminanti.

La valutazione del rischio posto all’uomo dalle EST animali rimane un obiettivo non compiutamente raggiunto. Le informazioni scientifiche che si vanno acquisendo sono talvolta contraddittorie e spesso difficilmente trasferibili in strategie sanitarie.

Se da una parte gli studi indicano che le curve epidemiche della BSE e della variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) sono in netto calo in Europa, recenti ricerche suggeriscono che il numero di casi di vMCJ (140 circa) potrebbe non rappresentare pienamente la realtà. Uno studio condotto nel Regno Unito per identificare i segni precoci dell’infezione su campioni ottenuti da tonsillectomie e appendicectomie, suggerisce infatti che il numero di soggetti clinicamente sani ma infetti sarebbe di gran lunga più elevato. Questo dato risulta ancor più allarmante in considerazione del recente riscontro, nel Regno Unito, del secondo caso di vMCJ imputabile a trasfusione ematica.

L’affinamento delle tecniche diagnostiche ha portato al recente riscontro di proteina prionica patologica o infettività nel tessuto muscolare e nel sangue di ovini, mentre le indagini di caratterizzazione dei ceppi di EST circolanti nel patrimonio ovino europeo hanno rimarcato la variabilità di questi agenti e identificato ceppi con caratteristiche vicine a quelle della BSE.

Proprio il rischio della circolazione della BSE tra i piccoli ruminanti è tra le maggiori preoccupazioni delle autorità sanitarie dell’UE. L’ambiziosissimo piano di selezione del patrimonio ovino europeo, volto ad incrementare il livello di resistenza genetica alle EST è paradigmatico della attenzione rivolta a queste malattie, ma anche dell’inadeguatezza delle misure tradizionalmente impiegate. La nuova strategia rappresenta una sfida, anche culturale, nel controllo di una malattia trasmissibile e le incognite non sono poche. Un attento governo sanitario dei piani di selezione e la loro aderenza alle nuove evidenze scientifiche, saranno cruciali per il loro successo.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI *ENT. FAECIUM* VANCOMICINO-RESISTENTE: RELAZIONE GENETICA TRA CEPPI DI ORIGINE UMANA E ANIMALE

Maria Grazia Bonora (a), Francesca Biavasco (b), Esther Manso (c), Erminia Stepan (d), Piero Marone (e), Laura Fossati (f), Annalisa Cavallero (g), Roberta Fontana (a)
(a) Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia, Università di Verona;
(b) Università di Ancona; (c) IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia; (d) Ospedale Civile Maggiore, Verona; (e) Ospedale Umberto I, Ancona; (f) Ospedale S.G. Battista, Torino;
(g) IRCCS S. Raffaele, Milano

La relazione filogenetica tra 42 ceppi di *Ent. faecium* vancomicino-resistenti e vancomicino-sensibili isolati da pazienti ospedalizzati, operatori sanitari e da fonti non umane (carne, animali da allevamento e domestici) è stata determinata mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e Multilocus Sequence Typing (MLST). La MLST è una tecnica di tipizzazione di recente ideazione che permette di stabilire la relazione genetica tra ceppi isolati in tempi diversi e da fonti diverse, mediante sequenziamento di 7 geni *housekeeping* (Homan *et al. J Clin Microb* 2002;40:1963-71). I ceppi di origine umana sono stati isolati nell'Ospedale S. Bortolo di Vicenza nel periodo 1993-1999 e negli ospedali S. G. Battista di Torino, S. Andrea di Vercelli, S. Raffaele di Milano, Ospedali di Bergamo, S. Matteo di Pavia, Ospedale Civile Maggiore di Verona, Policlinico di Verona, Cardiologico G. Lancisi e Umberto I di Ancona, nel quinquennio 2000-2004. I ceppi di origine non umana sono stati isolati da animali di allevamento (4 ceppi nel 1997), da feci di cane (3 ceppi nel 1996) e da carne di maiale e/o vitello acquistata al dettaglio (3 ceppi nel 2001). L'analisi del profilo elettroforetico generato tramite PFGE ha stabilito la mancanza di correlazione genica tra ceppi umani e non umani. Ha inoltre evidenziato la diffusione di ceppi vancomicino-resistenti con pulsotipo identico o strettamente correlato, in sette Ospedali del Nord Italia e in uno del Centro Italia durante il triennio 2000-2003. La MLST ha permesso di individuare 20 distinti *Sequence Types* (ST). Gli isolati appartenevano a tre principali linee genetiche (A, B, e C). La linea A è caratterizzata dall'assenza del gene di virulenza ed epidemicità *esp* e da sensibilità all'ampicillina, e include due ceppi isolati da carne di maiale, un ceppo proveniente da feci di cane, e due ceppi clinici. La linea B comprende ceppi con resistenza o sensibilità all'ampicillina e assenza del gene *esp* isolati da animali da allevamento, da feci di cane e da un operatore sanitario. Il gruppo C include solo ceppi di origine umana, sia vancomicino-resistenti che vancomicino-sensibili, resistenti all'ampicillina. Tre principali STs sono stati individuati: ST17, ST18 e ST78. STs 17 e 78 includono isolati epidemici con coefficiente di similarità del 20% caratterizzati dalla presenza del gene *esp* e dell'allele *purK1*, tipici della sublinea genetica C1 comprendente isolati epidemici a diffusione mondiale. In conclusione, la MLST ha confermato la mancanza di correlazione genetica, già evidenziata dalla PFGE, tra i ceppi umani e i ceppi non umani isolati nella stessa area geografica e nell'ambito di quelli di origine umana ha evidenziato la collocazione prevalente dei ceppi vancomicino-resistenti responsabili di epidemie nosocomiali nella stessa linea filogenetica.

RECENTI ACQUISIZIONI SU *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Paolo Aureli, Monica Virginia Gianfranceschi, Giovanna Franciosa
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Da quando, 25 anni fa casi epidemici di listeriosi umana, una malattia sistemica relativamente rara e non contagiosa, sono stati associati al consumo di alimenti contaminati dalla *Listeria monocytogenes* (L.m.) l'interesse per questo microrganismo è andato crescendo in maniera esponenziale nella comunità scientifica che si occupa di sicurezza alimentare non solo perché la malattia si può manifestare in forma epidemica ma anche per l'alta percentuale di mortalità che la caratterizza.

Oggi, la L.m. è considerato uno dei maggiori patogeni alimentari per l'uomo, responsabile di infezioni opportunistiche, a carattere sporadico o epidemico, in certe fasce di popolazione a rischio (individui immunocompromessi, anziani, neonati, donne in gravidanza). È stato anche dimostrato che *L. monocytogenes* può causare una sindrome gastroenterica febbrile negli individui sani senza evolvere nella forma invasiva.

Il recente sequenziamento dei genomi di *L. monocytogenes* e di *L. innocua*, e il paragone tra le sequenze ottenute ha reso possibile l'identificazione di nuovi specifici fattori di virulenza (ami, lma, gtcA, ecc.), e chiarito il complesso meccanismo che permette al microrganismo di causare la forma classica invasiva. Rimangono, tuttavia, ancora da chiarire le ragioni della diversa patogenesi nelle 2 forme di listeriosi.

Molti Paesi industrializzati hanno da tempo sviluppato un sistema di sorveglianza della listeriosi; in alcuni casi, esso è stato attivato proprio dopo il riconoscimento delle epidemie alimentari. Fatta eccezione degli USA (incidenza: 10/1.000.000 abitanti), dove dal 1996 opera un sistema di sorveglianza molecolare a livello nazionale (*Foodnet*), i dati relativi all'incidenza della malattia sono sottostimati in tutti i Paesi. Dei 13 sierotipi noti di L.m. quelli isolati dall'uomo e dagli alimenti appartengono nel 95% dei casi ai sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b anche se con frequenze diverse. Data la rilevanza epidemiologica della tipizzazione sono stati sviluppati numerosi metodi molecolari alternativi a quelli fenotipici classici per il maggior potere discriminante.

Dopo che l'alimento è stato riconosciuto come uno dei principali veicoli dell'infezione, numerose ricerche hanno permesso di stabilire la sua prevalenza in vari tipologie di prodotti, mediante metodi tradizionali validati; sono stati anche proposti numerosi metodi alternativi, immunoenzimatici e molecolari. È stata anche correlata la presenza della L.m. negli alimenti alla capacità di resistere a molti metodi di conservazione, alla capacità di colonizzare impianti di lavorazione e di sopravvivere a condizioni ambientali sfavorevoli. Per ridurre il rischio della contaminazione degli alimenti pronti sono state messe a punto numerose nuove strategie d'intervento basate sul ricorso a fattori di controllo della crescita o sopravvivenza del microrganismo alternativi a quelli tradizionali.

Ai fini della valutazione della sicurezza alimentare è in avanzata fase di sviluppo in ambito internazionale e comunitario la definizione di criteri microbiologici basati sull'analisi quantitativa del rischio.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELL'EPATITE DI TIPO E IN ITALIA

Luisa Romanò, Silvia Bianchi, Alessandro Zanetti
Istituto di Virologia, Università degli Studi di Milano

Il virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV) è il maggior responsabile delle epatiti nAnB a trasmissione enterica. L'HEV, un virus a forma sferica privo di envelope, è stato prima classificato nelle Caliciviridae e, recentemente, come membro prototipo del gruppo *Hepatitis E-like Viruses*. Il genoma, un RNA a singola elica con polarità + di circa 7,6 Kb, codifica per proteine strutturali e non strutturali; è costituito da 3 differenti ORF discontinui e parzialmente sovrapposti: l'ORF1 codifica proteine di funzione (elicasi e RNA polimerasi); l'ORF2 codifica proteine strutturali del capsido; infine l'ORF3 codifica proteine a funzione non chiara. Lo studio delle sequenze genomiche di HEV isolati durante epidemie di differenti aree geografiche, ha permesso di identificare diversi isolati virali, primi fra i quali il ceppo Birmano, Messicano e Pakistano. Recentemente, è stata proposta la classificazione degli isolati di HEV in 4 maggiori genotipi (I-IV) oppure, secondo ulteriori analisi, in almeno 9 differenti gruppi. Il gruppo I comprende i genotipi Birmani, Indiani, Cinesi e Pakistano, il gruppo II il ceppo Messicano, il gruppo III gli isolati Statunitensi e il gruppo IV è caratterizzato dall'isolato Cinese Ct1. Le caratteristiche cliniche dell'epatite acuta E sono simili a quelle dell'epatite A. L'epatite E è una malattia che si autolimita senza cronicizzare; la sovrainfezione con altri virus epatitici può tuttavia aggravare il quadro clinico. Se l'infezione è contratta in gravidanza (specialmente nel 3° trimestre) la malattia è particolarmente grave, con tassi di mortalità fino al 30%. L'HEV si trasmette principalmente per via feco-orale. Nei Paesi in via di sviluppo il virus facilmente contamina l'acqua potabile e gli alimenti, che diventano i veicoli sia di vaste epidemie che di casi sporadici. La presenza di casi sporadici consente la circolazione del virus durante i periodi interepidemici; recentemente è stata ipotizzata la presenza di serbatoi non-umani di infezione. In Europa e USA l'infezione da HEV è stata occasionalmente segnalata in soggetti di ritorno da aree endemiche; casi sporadici sono stati osservati anche in pazienti che non si erano mai recati all'estero. Nei Paesi industrializzati la prevalenza di anti-HEV varia dall'1 al 6% in donatori di sangue, con valori più elevati tra tossicodipendenti (soprattutto se HIV+), emofilici, emodializzati, omosessuali e pazienti con epatite cronica C. Mancando un vaccino, la prevenzione dell'epatite E è affidata alle misure generali volte al controllo delle infezioni a trasmissione enterica, quali il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie e il controllo delle acque.

RUOLO DELL'ACQUA E DEGLI ALIMENTI NELLA TRASMISSIONE DEI PROTOZOI *CRYPTOSPORIDIUM* E *GIARDIA*

Simone Mario Cacciò
Istituto Superiore di Sanità, Roma

I protozoi appartenenti ai generi *Cryptosporidium* e *Giardia* rappresentano la più frequente causa di infezioni gastrointestinali dell'uomo a livello mondiale, e rivestono notevole interesse anche in campo veterinario. Nell'uomo, le categorie a rischio sono rappresentate dai bambini sotto i 5 anni di età, dagli anziani e dagli individui immunodepressi, nei quali la criptosporidiosi e la giardiasi si manifestano con quadri clinici gravi, con tendenza alla disseminazione in siti extra-intestinali cui si aggiunge, nel caso della criptosporidiosi, la mancanza di una terapia efficace. Il quadro epidemiologico è complesso, in ragione dell'esistenza di numerose modalità di trasmissione, che includono i contatti uomo-uomo, la trasmissione zoonotica, e quella legata al consumo di cibi e acqua contaminati. Questo quadro è ulteriormente complicato dal fatto che l'infezione umana può essere causata da diverse specie e/o genotipi di *Cryptosporidium* e di *Giardia*, che sono distinguibili solo attraverso analisi molecolari.

Nei Paesi industrializzati, l'acqua (sia potabile che ricreazionale) e il cibo rappresentano probabilmente le più importanti vie di trasmissione. La trasmissione di questi protozoi è facilitata da numerosi fattori. In particolare, le forme infettive e di resistenza, ovvero l'oocisti di *Cryptosporidium* e la cisti di *Giardia*, sono particolarmente robuste e sopravvivono a lungo nell'ambiente. Inoltre, a fronte dell'enorme numero di cisti/oocisti che vengono eliminate con le feci da un singolo ospite, la dose infettiva è molto bassa (circa 10 organismi). Infine, la disseminazione delle feci nell'ambiente può portare alla contaminazione dei cibi, attraverso l'irrigazione o per contatto diretto, oppure dell'acqua dove, in virtù della loro resistenza ai processi di depurazione, le cisti/oocisti persistono mantenendo la capacità infettività.

Queste proprietà rendono conto del crescente numero di epidemie legate al consumo di acqua e cibo contaminati che sono state registrate in Europa e in America, e che ha portato alcuni paesi a promuovere specifiche misure di controllo. Una serie di studi condotti su acque di diversa tipologia (di superficie, potabili, reflue) raccolte in diversi continenti ha dimostrato la presenza di questi protozoi in gran parte dei campioni, a conferma della sostanziale ubiquità della contaminazione ambientale. Gli studi sugli alimenti, senz'altro più limitati, hanno mostrato la presenza di cisti/oocisti in svariati campioni di frutta e di verdura, nonché in alcuni organismi filtratori (ostriche, cozze e vongole). Tuttavia, per una obiettiva valutazione del rischio di infezione associato all'acqua e agli alimenti, la natura della specie, e quindi la sua patogenicità per l'uomo, deve essere determinata mediante l'uso di tecniche molecolari.

COMUNICAZIONI ORALI E POSTER

Prima sessione
Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche
Enter-net Italia: presentazione delle attività 2003-2004

P1. SALMONELLE DA UOMO, ALIMENTI, ANIMALI: FREQUENZE DI ISOLATI TIPIZZATI PRESSO L'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA, 1997- 2003

Antonio Battisti, Alessia Franco, Anna Paola Salinetti, Rita Tolli, Gina Di Giampietro,
Maria Grazia Marrocco, Carmela Buccella, Cinzia Onorati, Stefano Bilei
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

Le serie dal 1997 al 2003, relative ai più frequenti sierotipi di Salmonella isolati da campioni umani, da alimenti e animali, tipizzati presso il Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana dal 1997 al 2003 sono riportate nel presente lavoro. Il numero per anno degli isolati nel periodo varia a seconda della matrice e degli anni (uomo: media 724, DS (Deviazione Standard) 314; alimenti: media 157, DS 69; animali: media 125, DS 27)

I sierotipi più importanti negli ultimi sei anni, sono, in accordo con i dati nazionali, *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (STM).

Nell'uomo, STM risulta sempre più rappresentata a partire dal 1998 (27%) fino al 2002 (45%). Dal 1999 la tendenza all'aumento risulta di tipo lineare e statisticamente significativa (*Chi square for linear trend p-value* <0.001). SE raggiunge un picco nel 1998 (47%) per poi mantenere frequenze simili nel 1999. A partire dal 2000, per SE si osserva un netto decremento, probabilmente perché l'implementazione dei sistemi di prevenzione primaria in Sanità Animale e Pubblica Veterinaria (nella filiera di produzione delle uova e ovoprodotti) ne ha ridotto l'impatto sull'uomo (da 41% nel 2000 a 21% nel 2002). Tale tendenza appare di tipo lineare e statisticamente significativa (*Chi square for linear trend p-value* <0,001). Dal 2001, il sierotipo più frequentemente nell'uomo risulta STM. La situazione cambia nel 2003, in cui SE risulta di nuovo il sierotipo più rappresentato, in accordo con le tendenze nazionali. Se il dato sia da associarsi ad un nuovo aumento di prevalenza di allevamenti infetti e di ovaiole eliminatrici attraverso l'uovo (principale fonte di contaminazione sa SE di alimenti di origine animale), non è tuttora chiaro.

Riguardo agli isolati da alimenti analoga tendenza all'aumento di rappresentatività, a partire dal 1999, si osserva per STM (*Chi square for linear trend p-value* <0.001). Circa SE, la tendenza alla diminuzione di rappresentatività sul totale isolati, a partire dal 1999, è interrotta da un nuovo aumento nel 2001, per poi decrescere e annullarsi nel 2002. Negli isolati da animali non si riscontra alcuna delle situazioni descritte. Circa gli altri sierotipi più frequenti, da alimenti e animali prevale *S. Derby*, che risulta il terzo sierotipo in ordine di frequenza in alimenti di origine animale, ed è il quarto sierotipo più frequente anche da campioni umani. *S. Infantis*, terzo sierotipo per frequenze nell'uomo, è scarsamente rappresentato da alimenti e animali. Questo dato sembra suggerire che circuiti alternativi potrebbero essere fonti prevalenti di infezione per l'uomo.

ISOLAMENTI DI *SALMONELLA* SPP. DA FONTI AMBIENTALI: DATI 2003

Giuseppe Cirillo (a), Marta Ranieri (b), Daniela Caroli (c), Giuseppe Mercati (d), Marina Molina (e), Ludwig Moroder (f), Annamaria Manuppella (g)

(a) ARPA Emilia/Romagna, (b) ARPA Forlì/Cesena, (c) ARPA Piemonte, (d) ARPA Lazio, (e) ARPA Liguria, (f) APPA Bolzano, (g) ARPA Molise

L'ubiquitarità del genere *Salmonella* trova una costante verifica nel suo isolamento in matrici ambientali naturali (acque di scarico, acque superficiali, laghi, mare, liquami e fanghi) e artificiali (superfici, strumenti, utensili, etc.). In particolare nell'ambiente acqueo si nota una marcata eterogeneità di specie che non si verifica nelle matrici alimentari e nell'uomo ove prevale una certa omogeneità. Ne consegue che alcune matrici ambientali (acque superficiali, fanghi, ecc.) costituiscono l'habitat ideale per un *pool* di specie di cui solo alcune compiono il ciclo completo passando agli animali e poi eventualmente all'uomo.

Nell'ambito del progetto Enter-net, la ricerca di *Salmonella* spp. nell'ambiente è generalmente effettuata dalle ARPA, ma non tutte le Regioni svolgono questo tipo di attività analitiche anche a causa delle differenti competenze che le Agenzie hanno assunto nelle diverse Regioni. Nonostante questo si è riusciti a costituire Centri di Riferimento Regionali in Piemonte, Liguria, Provincia Autonoma di Bolzano, Emilia-Romagna, Molise, Lazio. Questi Centri sono operativi da tempo e offrono il loro servizio trasversale non solo per i Laboratori di Microbiologia Ambientale, ma anche come service di Laboratori Ospedalieri e di servizi Veterinari limitatamente agli alimenti, farmaci e cosmetici di origine vegetale. Nel 2003, i Laboratori sopra indicati, hanno isolato e tipizzato 1911 ceppi di cui 1441 da matrice ambientale, 40 da matrice alimentare e 430 da matrice umana. Dei 1441 ceppi ambientali, 1046 (72,59%) da acqua superficiale (fiumi, laghi, mare, acque reflue) 132 (9,16%) da acque di scarico, 198 (13,74%) da fanghi di depurazione, 65 (4,51%) da altre fonti.

I primi cinque sierotipi isolati da matrici ambientali sono *S. Typhimurium* 237 (16,45%), seguito da *S. Infantis* 121 (8,40%), *S. Veneziana* 110 (7,63%), *S. London* 87 (6,04%) e *S. Livingstone* 50 (3,47%). A parte *S. Veneziana*, che non trova quasi riscontro negli isolamenti umani (0,1% negli ultimi 20 anni) e animali (pollo, suino, rettili), gli altri quattro sierotipi entrano nei dieci sierotipi isolati più frequentemente nello stesso periodo da infezioni umane. *S. Enteritidis*, isolata dal 20% delle infezioni umane, rappresenta solo il 2,5% degli isolamenti ambientali. A differenza degli stipiti umani, nell'ambito dei quali i cinque sierotipi più frequenti rappresentano circa il 90% dei totali, i cinque sierotipi più diffusi tra gli isolati ambientali sono solo il 40% del totale.

La elevata variabilità di sierotipi tra gli isolati ambientali può essere dovuta all'esistenza di differenti e numerosi serbatoi naturali, dagli animali da allevamento alle specie selvatiche. La costituzione di una rete dedicata di sorveglianza ambientale potrebbe garantire una miglior copertura del territorio e la disponibilità di dati più accurati consentendo di valutare meglio il ruolo che l'ambiente gioca nella trasmissione dei patogeni enterici all'uomo.

P2. EPISODIO FAMILIARE DI COLITE EMORRAGICA DA E. COLI O157 DA INSACCATO SUINO CONTAMINATO

Gabriella Conedera (a), Evio Mattiazzi (b), Francesca Russo (c), Edoardo Chiesa (d), Ivano Scorzato (e), Stefano Grandesso (f), Alida Bessegato (f), Alessandro Fioravanti (g), Alfredo Caprioli (g)

(a) *IZS delle Venezie, Pordenone*; (b) *Ospedale San Camillo ULSS 4 Alto Vicentino, Schio (VI)*; (c) *Dipartimento di Prevenzione ULSS 4 Alto Vicentino, Thiene (VI)*; (d) *SIAN ULSS 4 Alto Vicentino, Thiene (VI)*; (e) *Servizio Veterinario ULSS 4 Alto Vicentino, Thiene (VI)*; (f) *Centro Enterobatteri Patogeni della Regione Veneto, Presidio Ospedaliero di Treviso*; (g) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le infezioni da *E. coli* O157 produttore di verocitotossina (VTEC O157) costituiscono un'importante zoonosi trasmessa da alimenti. Il principale serbatoio animale è costituito dai ruminanti e l'infezione è spesso acquisita attraverso il consumo di prodotti carnei di origine bovina contaminati. Viene qui riportato un episodio di colite emorragica verificatosi in un nucleo familiare composto da tre persone: madre, padre e figlia, dovuto al consumo di un insaccato suino. Mentre la figlia aveva un quadro lievissimo, il 24-01-2004 si presentavano al pronto soccorso dell'Ospedale di Schio (VI): la moglie con diarrea ematica, dolori addominali e nausea; il marito, con sintomi simili ma meno gravi. I due coniugi, di 56 e 64 anni, venivano ricoverati entrambi in chirurgia e sottoposti a colonscopia, che rilevava una mucosa flogistica, edematosa, friabile, con aree iperemiche. L'esame delle feci su Sorbitol McConkey Agar rivelava per entrambi presenza di *E. coli* O157 sorbitolo negativo. I pazienti venivano dimessi il 06-02-04 completamente ristabiliti. L'analisi epidemiologica condotta dall'ASL rilevava che i pazienti risiedevano in contesto urbano, non possedevano animali e l'unico alimento in comune era un salame tradizionale veneto con aglio consumato il 18 e il 20-01-04. Il salame, prelevato presso l'abitazione il 4-02-04, era analizzato presso l'IZS delle Venezie con la tecnica dell'immunoseparazione (procedura ISO 16654:2001). *E. coli* O157 veniva isolato da un campione di 50 g prelevato in profondità, mentre risultavano negativi altri 3 prelievi di 25 g. I ceppi di VTEC O157 isolati dai due pazienti e dal salame risultavano positivi alla PCR per geni *vt1*, *vt2* ed *eae*, e presentavano lo stesso profilo di PFGE. Il valore aW del salame era 0,90 e l'analisi di specie in immunodiffusione dimostrava l'assenza di carne bovina, ovina e di pollo. L'insaccato era stato acquistato in un panificio con alimentari del paese e proveniva da un lotto di circa 600 salami prodotti ai primi di dicembre 2003 in un salumificio artigianale della zona, relativamente al quale non vi sono state ulteriori segnalazioni. La descrizione del caso appare rilevante in quanto i prodotti a base di carne suina non sono generalmente considerati a rischio di trasmissione di VTEC O157. Il suino, infatti, non rappresenta un serbatoio significativo di tale microrganismo: studi europei, inclusa l'Italia, hanno evidenziato una prevalenza di portatori fecali in suini al macello che andava da 0 all'1%. Solo l'approfondimento delle indagini e la stretta collaborazione tra SIAN, Servizio Veterinario e laboratori hanno permesso di dimostrare un veicolo alimentare d'infezione da *E. coli* O157 inconsueto sia per la specie da cui deriva sia per motivi tecnologici, legati alla stagionatura e alla competizione microbica di questo tipo di prodotto.

P3. FREQUENZE DI ISOLAMENTO DI SALMONELLE NELLA REGIONE PIEMONTE NEL PERIODO LUGLIO 2003-GIUGNO 2004

Ilaria Crespi, Vesselina Kroumova, Gian Lorenzo Molinari, Stefano Andreoni,
Giacomo Fortina
Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AO "Maggiore della Carità", Novara

Le Salmonelle, agenti patogeni responsabili di infezioni di tipo setticemico o di tipo gastroenterico, rappresentano ancora oggi un importante problema di sanità pubblica sebbene spesso siano responsabili di forme autolimitanti.

Nell'ambito del "Progetto di Sorveglianza Sanitaria delle Malattie Trasmesse da Alimenti", nell'aprile 2001 ha avuto inizio presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'AO Maggiore della Carità di Novara, l'attività di Centro di Riferimento Regionale per la sierotipizzazione delle Salmonelle.

Dopo un inizio difficoltoso, in questi ultimi anni, e in particolare in quello in corso, si è verificato un notevole incremento di invio dei ceppi, con un coinvolgimento di un sempre maggior numero di centri abbinato ad una migliore gestione del progetto.

Nell'ultima annata (luglio 2003-giugno 2004) sono state inviate 601 Salmonelle provenienti da 24 Centri del Piemonte, con un incremento rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente del 79,4% di ceppi inviati.

Le Salmonelle di più frequente isolamento in questo ultimo anno, sono risultate essere *Typhimurium* (44,4%) ed *Enteritidis* (29,5%) seguite poi da Derby (4,2%), Muenchen (3,3%), Rissen (1,5%), Infantis (1,3%) oltre a numerosi altri sierotipi con percentuali minori.

S. Typhimurium ha quasi sempre mantenuto una percentuale maggiore di isolamenti tranne nel mese di maggio 2004 in cui il numero di *S. Enteritidis* è stato di circa tre volte quello di *Typhimurium*, dato probabilmente legato ad un focolaio che ha coinvolto la provincia di Torino.

Si è valutata la resistenza solo per la *S. Typhimurium* e per la *S. Enteritidis* visto il numero elevato di isolamenti.

Le *S. Typhimurium* che hanno mostrato almeno una doppia resistenza sono risultate predominanti con una percentuale dell'80,5%. Da notare anche che il 7,7% di queste presentavano una resistenza a cinque o più antibiotici.

Per la *S. Enteritidis* si è confermato il dato della letteratura con una percentuale di resistenza molto inferiore, infatti l'81,6% era sensibile a tutti gli antibiotici saggiati.

P4. CARATTERIZZAZIONE DI STIPITI DI SALMONELLA SIEROTIPO 4,[5],12:i:- ISOLATI NELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA NEGLI ANNI 2003-2004

Paola De Santis (a), Anna Paola Salinetti (a), Ilaria Ciabatti (b), Rita Tolli (a), Ida Luzzi (c), Stefano Bilei (a)

(a) IZS delle Regioni Lazio e Toscana, Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni, Roma; (b) IZS delle Regioni Lazio e Toscana, Dipartimento Virologia e Biotecnologie, Roma; (c) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel rapporto annuale su Salmonella per l'anno 2002, il Centro di Prevenzione e Controllo delle Malattie trasmesse con gli alimenti (CDC, Atlanta, USA), riporta la frequenza dei 20 sierotipi più comunemente isolati di Salmonella, il sierotipo 4,[5],12:i:- è al 18° posto. Identificato in Spagna fin dal 1997, è il quarto più comunemente isolato nel 1998 nello stesso Paese. L'analisi genetica dei ceppi isolati in Spagna ha rilevato strette correlazioni con *S. Typhimurium*, allo stesso modo negli USA, dove sulla base del profilo in PFGE è stato ipotizzato che il sierotipo non sia altro che una variante di *S. Typhimurium*. In Italia, il Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), ha sierotipizzato come 4,[5],12:i:-, 68 ceppi durante il periodo 2000-2003. Il presente studio prende in esame complessivamente 33 isolati di Salmonella di origine veterinaria e umana, di cui 27 appartenenti al nuovo sierotipo 4,[5],12:i:-, 4 di incerta sierotipizzazione e 2 *S. Typhimurium* di campo. Tutti i ceppi sono stati sierotipizzati secondo lo schema di Kaufmann-White presso l'Istituto Zooprofilattico delle Regioni Lazio e Toscana, Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni, durante il periodo 2003-2004. In 3 dei 4 casi di dubbia sierotipizzazione, gli isolati sono stati esaminati anche da altri Laboratori, ottenendo risultati discordanti. I 33 isolati sono stati quindi sottoposti a tipizzazione molecolare mediante multiplex PCR per l'identificazione degli assetti antigenici corrispondenti agli antigeni: H:1,2; H:1,5; H:1,6 e H:1,7, secondo il metodo proposto da Echeita e Usera (1998). Per l'esecuzione della prova, i ceppi batterici sono stati seminati in terreno liquido BHI (Brain Heart Infusion), incubati *overnight*, successivamente sottoposti ad estrazione del DNA mediante kit commerciale (Qiagen) e ad amplificazione specifica evidenziata mediante bande di 394bp per H:1,2; 103bp per H:1,5; 291bp per H:1,6 e 195bp per H:1,7. Dei 27 ceppi identificati come sierotipo 4,[5],12:i:-, 8 (29,6%) non hanno ottenuto risultati concordanti con i metodi utilizzati, per i 4 la cui sierotipizzazione non risultava certa, la PCR multiplex ha confermato la presenza del nuovo sierotipo in 3. La presenza dell'antigene H:1,2 è stata confermata nei 2 isolati di campo di *S. Typhimurium*. L'applicazione del metodo molecolare ha ribadito le difficoltà già riscontrate nella tipizzazione sierologica di Salmonella 4,[5],12:i:-, ulteriormente sottolineate dai risultati discordanti ottenuti sugli stessi ceppi da Laboratori diversi. La necessità di procedere a ripetute inversioni di fase per l'individuazione della seconda fase flagellare, rende inoltre il metodo sierologico lungo e indaginoso. I metodi molecolari quindi in questi casi possono fornire una valida alternativa non solo in termini di affidabilità del risultato ma anche in termini di rapidità di esecuzione.

P5. ISOLAMENTI DI SALMONELLA SPP. DA MATRICI ALIMENTARI E DI ORIGINE UMANA NELLA REGIONE PIEMONTE

Lucia Decastelli (a), Antonio Barbaro (a), Silvia Gallina (a), Ilaria Crespi (b),
Vesselina Kroumova (b), Laura Chiavacci (a)

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

(b) Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara

Scopo del lavoro è stato quello di valutare la presenza di *Salmonella* spp. in matrici alimentari e in matrici di origine umana sul territorio piemontese negli anni 2002-2003. Il lavoro è stato svolto di concerto tra i laboratori dell'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, deputati al controllo delle matrici alimentari, e il Centro di Riferimento per la Tipizzazione delle Salmonelle piemontese istituito presso l'Ospedale Maggiore di Novara, per quello che riguarda le matrici umane (feci). Le salmonelle, isolate con le normali metodiche routinarie, sono state sierotipizzate (schema Kauffmann-White 2003).

Negli anni considerati sono stati isolati, da alimenti di origine animale, 118 stipiti di *Salmonella* spp. (65 nel 2002 e 53 nel 2003). Nell'anno 2002 si rileva una netta predominanza di *S. Typhimurium* (23,09%), seguita da *S. Derby* (18,46%); *S. Enteritidis*, invece, risulta isolata solamente in 3 campioni (4,62%). Durante il 2003, invece, si ha un'inversione di tendenza: il sierotipo più frequente, infatti, risulta essere *S. Enteritidis* (20,75%). *S. Typhimurium*, invece, è stata isolata solamente in cinque campioni (9,43%).

Importante sottolineare che in entrambi gli anni è stato isolato, in tre campioni, un "nuovo sierotipo" non ancora denominato.

Osservando i sierotipi isolati da matrici umane si rileva quanto segue: presso il centro di riferimento in umana sono stati tipizzati, nel biennio considerato, 770 stipiti (288 nel 2002 e 482 nel 2003). Come per le matrici di origine alimentare il 2002 è contrassegnato da una prevalenza di *S. Typhimurium* (56,94%) rispetto a *S. Enteritidis* (22,57%). Anche in campo umano, però, nell'anno 2003 si rileva un aumento relativo di *S. Enteritidis* (31,95%) verso *S. Typhimurium* (47,72%) che mostra un decremento rispetto all'anno precedente.

Inoltre, è importante osservare come, in generale, i sierotipi isolati più frequentemente negli alimenti siano sovrapponibili a quelli provenienti da casi umani; questo conferma l'ipotesi che all'origine della malattia nell'uomo ci sia il consumo di alimenti di origine animale. Da qui la necessità di avviare programmi di sorveglianza epidemiologici mirati finalizzati al controllo di tutta la filiera produttiva, fino al consumatore finale.

CLUSTER DI INFEZIONI DA *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* DT 104A NELL'AREA DI ROMA: UNO STUDIO CASO-CONTROLLO

Pasquale Galetta (a), Stefania Salmaso (a), Marco Massari (a), Susanna Lana (a), Barbara Bagnato (a), Emma Filetici (a), Sergio Arena (a), Anna Maria Dionisi (a), Ildo Benedetti (a), Amy Cawthorne (a) Alberto E. Tozzi (b), Marta Argentieri (b), Anna Portanova (b), Alberto Piccoli (c), Pierangela Napoli (d), Massimo O. Trinito (e), Rosaria Loffredo (f), Alessio Pendenza (g), Elettra Santarelli (g), Ida Luzzi (a)
(a) Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Ospedale Pediatrico Bambino Gesù Roma, (c) ASL RMA, (d) ASL RMB, (e) ASL RMC, (f) ASL RMD, (g) ASL RME

Salmonella enterica serovar *Typhimurium* (STM) con resistenza multipla agli antibiotici appartenente al fagotipo (DT) 104 è un patogeno che si è diffuso rapidamente in tutto il mondo a partire dagli anni '80. Nell'ambito del progetto di sorveglianza delle salmonellosi Enter-net Italia, gli stipiti di STM isolati dai laboratori della rete vengono inviati a campione all'Istituto Superiore di Sanità per essere caratterizzati attraverso fagotipizzazione, profilo di antibiotico resistenza e analisi molecolare mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Durante il mese di giugno 2004, 58 ceppi di STM, sono risultati appartenere al fagotipo DT104A, un sottotipo di DT104 piuttosto raro, mai osservato tra i ceppi pervenuti nel corso degli ultimi due anni. Tutti i 58 ceppi risultavano sensibili al pannello di antibiotici previsti dal protocollo Enter-net e mostravano lo stesso profilo elettroforetico in PFGE. Dall'analisi del database Enter-net è risultato che tutti i ceppi, eccetto 2 stipiti provenienti dall'ospedale di Spoleto, erano stati isolati da casi di gastroenterite, apparentemente non correlati tra loro, verificatisi a Roma e provincia a partire dalla fine di marzo 2004 e per la maggior parte concentrati nel mese di aprile. Si trattava in maggioranza di soggetti in età pediatrica e 22 erano casi ricoverati presso l'Ospedale Bambino Gesù. L'ultimo stipite di STM con le caratteristiche del ceppo "epidemico" è stato isolato alla fine di maggio. I casi rintracciabili al momento dello studio (43/58) sono stati intervistati per telefono per indagare circa le potenziali esposizioni all'infezione e i consumi alimentari. Al fine di identificare il veicolo di trasmissione delle infezioni nell'area di Roma è stato condotto uno studio caso-controllo. Per ogni caso (soggetto con coprocultura positiva per STM DT 104A) è stato identificato il medico di base e dell'elenco degli assistiti sono stati selezionati fino a 4 controlli appaiati per età e area di residenza (CAP). I controlli sono stati così intervistati sulle potenziali esposizioni. L'analisi statistica è stata effettuata applicando la regressione logistica condizionata realizzata con il software EpiInfo, ver.3.2. Lo studio analitico ha incluso 26 casi e 63 controlli e dall'analisi univariata appaiata è emerso che l'acquisizione dell'infezione è associata in modo statisticamente significativo (OR=5,9; 95% IC: 1,6-22,1) al consumo di un salume tipico del periodo pasquale (salame tipo corallina). Questo lavoro mostra ancora una volta il valore di una dettagliata caratterizzazione etiologica di infezioni per il riconoscimento di epidemie e come la conduzione di indagini epidemiologiche analitiche sia in grado di fornire indicazioni circa i veicoli dell'agente etiologico.

P6. SALMONELLA THOMPSON: EPISODIO EPIDEMICO IN UNA MENSA SCOLASTICA

Luigi Genghi (a), Rita Ferrini (a), Loretta Vai (a), Anna Maria Dionisi (b),
Emma Filetici (b), Concetta Scalfaro (b), Ida Luzzi (b)

(a) Azienda U.S.L. 6 Livorno Zona Elba

(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Salmonella Thompson è un sierotipo poco frequente in Italia, i dati della sorveglianza Enter-net e Enter-vet relativi agli ultimi anni mostrano una frequenza di isolamento inferiore all'1% da fonte umana e di circa il 2% da animali (pollo).

Ad aprile 2004 si è verificato un episodio epidemico causato da questo sierotipo che ha coinvolto bambini frequentanti asili nido, scuole materne e scuole elementari dell'Isola d'Elba. Le scuole coinvolte usufruivano dei pasti preparati presso una mensa centralizzata, appaltata, allo scopo, dall'amministrazione comunale.

Nell'ambito di un routinario controllo di vigilanza, il martedì 6 aprile venivano effettuati campionamenti di alcuni cibi rappresentativi del menù previsto per quella data. Il giorno successivo, a seguito di segnalazioni di casi di gastroenterite nelle scuole materne, sono stati effettuati ulteriori campionamenti relativamente agli alimenti preparati, presso la stessa struttura, nei giorni precedenti. In tal modo si è avuta la possibilità di analizzare campioni di alimenti risalenti anche ad oltre 72 ore dall'inizio della sintomatologia.

Giungendo l'esito ufficiale della presenza di *Salmonella* in alcuni cibi analizzati, nonché della positività allo stesso germe delle coproculture eseguite a carico di 5 dipendenti della mensa (4 cuoche e 1 sporzionatrice), si chiedeva al Sindaco l'immediata cessazione dell'attività di preparazione dei pasti e ogni altra necessaria precauzione al fine di delimitare il focolaio epidemico.

Il focolaio ha interessato 77 bambini (su un totale di 330 che usufruivano della mensa) di età compresa tra tre mesi e nove anni, di cui 54 sintomatici e 23 asintomatici. La sintomatologia si è appalesata, dopo un periodo di incubazione massimo di 24 ore, in particolar modo con febbre e diarrea profusa. Il maggior numero di casi si è verificato tra i bambini delle scuole materne dove gli alimenti venivano serviti "sminuzzati".

I ceppi di *Salmonella* isolati dai casi, dai portatori asintomatici e dagli alimenti sono stati sierotipizzati e analizzati mediante elettroforesi in campo pulsato. Tutti i ceppi sono risultati appartenere al sierotipo *Thompson* e hanno mostrato un identico profilo elettroforetico.

A conclusione delle indagini, si può ipotizzare che la fonte del contagio era rappresentata da un'addetta della mensa che, sottovalutando una manifestazione gastroenterica pregressa, si è comunque recata al lavoro: un lavaggio poco accurato delle mani, unitamente a modalità non appropriate di manipolazione dei cibi, avrebbe determinato la contaminazione dei piani di lavoro, degli utensili e quindi del cibo stesso, che, consumato anche dalle altre colleghe, ha causato loro lo stato di portatrici sane. Da qui il nascere dell'evento epidemico.

P7. INDAGINE RETROSPETTIVA SULL'ISOLAMENTO DI SALMONELLA SPP. DA MATERIALI NON FECALI NELL'OSPEDALE DI TREVISO: 01/01/1997-31/07/2004

Stefano Grandesso, Alida Bessegato, Attilio Mottola
Unità Operativa di Microbiologia, Presidio Ospedaliero di Treviso

Gli isolamenti di Salmonella da materiali fecali costituiscono un evento frequente nei Laboratori di Microbiologia, ma non altrettanto si può dire per quelli provenienti da altre tipologie di campioni biologici.

In tal senso è stata condotta un'indagine retrospettiva sulle salmonelle isolate all'Ospedale di Treviso nel periodo compreso tra l'01/01/97 e il 31/07/04 provenienti da materiali non fecali.

Nel periodo osservato i pazienti coinvolti sono stati 45, provenienti da 17 reparti per un totale di 72 campioni positivi.

L'anno in cui percentualmente sul totale di Salmonelle isolate si sono avuti più casi di isolamenti da materiali non fecali è il 2004 (12,12%), quello con la percentuale minore il 1998 (0,64%).

Il sierogruppo di più frequente isolamento è risultato *S. Typhimurium* (29: 20 da sangue, 6 da urine, 1 da pus, 1 da trombo e 1 da frammenti tissutali), seguito da *S. Typhi* (15: 14 da sangue e 1 da urine), da *S. Enteritidis* (11: 9 da sangue, 1 da urine e 1 da liquido peritoneale), *S. Napoli* (3), *S. Anatum* (3), *S. Infantis* (2), *S. Orianenburg* (2), *S. Mbandaka* (2), *S. Livingstone* (2), *S. Paratyphi A* (1), *S. Derby* (1), *S. Arizona* (1).

Il materiale da cui con più frequenza sono state isolate è il sangue (52), seguito da urina (13), frammenti tissutali (2), liquido peritoneale (1), tampone ferita (1), pus (1), trombo (1), altri (1).

Sono state inoltre accertate l'esecuzione di controlli in campioni fecali, l'esecuzione di test sierologici (sierodiagnosi di Widal) e l'antibiotico-resistenza.

Concludendo, si evidenzia come gli isolamenti di Salmonella da materiali non fecali rappresentino un evento non frequente nelle comuni indagini di laboratorio, ma deve comunque essere tenuta presente la possibilità di isolare questo microrganismo da qualsiasi materiale, in particolare dal sangue e dalle urine.

P8. FAGOTIPIZZAZIONE E RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *S. TYPHIMURIUM* E *S. ENTERITIDIS* ISOLATE DA CASI UMANI E DA ANIMALI IN ITALIA NEL 2003 (ENTER-NET, ENTER-VET)

Caterina Graziani (a), Luca Busani (a), Antonia Ricci (b), Denis Vio (b), Sergio Arena (a),
Slawomir Owczarek (a), Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (a)

(a) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*

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

Le salmonelle sono ampiamente distribuite in natura, possono infettare mammiferi, uccelli, rettili e sono presenti anche nell'ambiente. Gli animali da allevamento sono i principali serbatoi d'infezione e, attraverso gli alimenti contaminati, l'infezione si può trasmettere all'uomo. Oltre al problema legato alle salmonellosi, recentemente suscita crescente preoccupazione il fenomeno dell'antibiotico-resistenza ad esse associato. *S. Typhimurium* (STM) e *S. Enteritidis* (SE) rappresentano in Italia i principali sierotipi isolati nell'uomo e negli animali. In questo studio sono riportati i dati su fagotipizzazione e antibiotico-resistenza in isolati del 2003 di STM e SE d'origine umana e animale. La fagotipizzazione e i test di sensibilità agli antibiotici sono stati effettuati presso i laboratori di referenza (Istituto Superiore di Sanità, e Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Padova) usando i metodi standard.

Nell'uomo, DT104 e DTNT (non tipizzabile) sono rispettivamente il 28,7% e il 22,4%. Negli animali DTNT è pari al 13,6% (84,1% da suino) e DT104 al 28,9% (35,8% da suino). In DT104 e in DTNT, indipendentemente dall'origine, la resistenza ad ampicillina (A), streptomina (S), sulfametoxazolo (Su) e tetraciclina (T) va dal 40% al 100%, mentre la resistenza al cloramfenicolo (C) è circa il 100% in DT104 e va dallo 0% al 40% (pollo) in DTNT. Gli altri fagotipi di STM mostrano percentuali simili.

I principali fagotipi di SE nell'uomo e negli animali sono PT4, PT21, PT1 e PT14b. Le percentuali di resistenza più elevate nell'uomo sono Su (21,1%), acido nalidixico (Na, 8,9%) e A (6,1%). Nel suino la resistenza a T, Na ed Su è rispettivamente 50,0%, 41,7% e 25,0%. Nel pollo la resistenza nei confronti di Su è del 36,7%, di Na del 16,3%, di S del 6,1% e di T del 2,0%.

In generale, STM ha resistenza e multiresistenza più elevate di SE. DT104 è il fagotipo più comune, indipendentemente dall'origine ed è associato al R-type ACSSuT. R-type ASSuT senza C, è osservato nei fagotipi DTNT, U302 ed RDNC. SE non ha particolari associazioni tra fagotipo e profilo di resistenza. R-type ACSSuT identifica DT104 ma non fornisce informazioni sulla fonte, in quanto questo fagotipo è ubiquitario, al contrario, R-type ASSuT è associato a fagotipi frequenti nell'uomo e nel suino, ma meno rappresentati in altre specie animali. R-type può essere un utile strumento per tracciare STM dal suino.

P9. SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA SALMONELLA SPP. IN MOLISE: RISULTATI 2003

Annamaria Manuppella (a), Carla Pepe (a), Rita De Socio (a), Luciana Di Pardo (a), Antonella Melloni (a), Antonio De Luca (b), Grazia Mancini (b), Annalisa Mollicelli (b), Renato Meo (c), Rosanna Palermo (d), Pietro Pannunzio (d), Roberta Ottaviano (e), Francesca Torti (e), Flavio Iammarino (f), Giovanni Ferillo (f), Massimiliano Scutellà (f), RosaMaria Benedetto (g), Carmela Mascilongo (g), Luigi Paolone (h)
(a) ARPA Molise Dipartimento Isernia (Centro di riferimento regionale Enter-net);
(b) ARPA Molise Dipartimento Campobasso; (c) Ospedale di Agnone; (d) Ospedale di Campobasso; (e) Ospedale di Isernia; (f) Ospedale di Larino; (g) Ospedale di Termoli;
(h) Ospedale di Venafro

La sorveglianza delle infezioni gastroenteriche svolta dal Centro di Riferimento Regionale Enter-net della Regione Molise, ha consentito nel 2003 la caratterizzazione sierologica di 88 stipti di *Salmonella* spp. isolati dai 6 laboratori ospedalieri che collaborano col Centro: Agnone, Isernia, Venafro, Campobasso, Larino e Termoli. I sierotipi più frequenti, *Typhimurium* ed *Enteritidis*, hanno rappresentato, cumulativamente, il 60% del totale degli isolamenti. Da segnalare il riscontro del sierotipo O:4,5;H:i;- , che circola nel territorio regionale dal 2000. La distribuzione mensile degli isolamenti ha evidenziato un addensamento dei casi nei mesi estivi, sostenuto principalmente dal sierotipo *Enteritidis*. La frequenza di isolamento è stata maggiore per la fascia di età pediatrica (47%), nell'ambito della quale il sierotipo *Typhimurium* ha causato in misura maggiore la malattia. La frequenza dei casi ospedalizzati è stata del 61%. Il fenomeno della resistenza agli antibiotici ha riguardato l'87% dei ceppi di *Typhimurium* e il 42,8% dei ceppi di *Enteritidis*. *S. Typhimurium* ha manifestato resistenza principalmente nei confronti di Sulfisoxazolo, Ampicillina, Tetraciclina, Streptomina, Trimetoprim, Cloramfenicolo; per questo sierotipo anche la multiresistenza agli antibiotici è stata molto marcata (93% dei ceppi resistenti); il pattern di multiresistenza più frequente (17,9%) è stato rilevato nei confronti di Ampicillina-Streptomina-Sulfisoxazolo-Tetraciclina (ASSuT); un identico "antibiotipo" è stato isolato nella Regione Molise nel 2000, causando una tossinfezione alimentare che ha coinvolto circa 100 persone. *S. Enteritidis* è risultata resistente prevalentemente a Sulfisoxazolo, Acido Nalidixico, Cefotaxime e Tetraciclina. Per questo sierotipo, che negli anni passati mostrava una notevole sensibilità agli antibiotici, il 50% degli stipti è risultato multiresistente, anche nei confronti di 7 antibiotici contemporaneamente (acido nalidixico, ampicillina, cloramfenicolo, kanamicina, streptomina, tetraciclina, trimetoprim). Le attività di sorveglianza, estese al comparto ambientale (acque superficiali e di scarico sull'intero territorio regionale), hanno consentito l'isolamento di 74 stipti; il sierotipo isolato con maggiore frequenza è stato *Typhimurium* (19%), seguito da *Infantis* (8%), sott. II 42;z;1,5 (7%), *Livingstone* (7%). Da sottolineare il riscontro, anche nel campo ambientale, del sierotipo O:4,5;H:i;- . Il 100% dei ceppi ambientali di *S. Typhimurium* ha manifestato resistenza agli antibiotici, principalmente nei confronti di Sulfisoxazolo (85,7%), Ampicillina (71,4%), Streptomina (64,0%) e Tetraciclina (64,0%); la multiresistenza ha riguardato il 78,6% dei ceppi; il pattern di multiresistenza più frequente è stato anche in questo campo ASSuT, con il 21,4% dei casi. Va rilevato che il sierotipo sott. II 42;z;1,5 circola nel territorio regionale dal 2000 e sembra aver colonizzato stabilmente le acque superficiali del territorio regionale.

P10. DISTRIBUZIONE DEI FAGOTIPI DI *S. ENTERITIDIS* ISOLATI NEL VENETO DAL 2003 AL PRIMO SEMESTRE 2004

Antonia Ricci (a), Veronica Cibin (a), Marzia Mancin (a), Giuseppina Chiaretto (a), Stefano Grandesso (b), Alida Bessegato (b), Cristina Saccardin (a), Lisa Barco (a), Attilio Mottola (b)

(a) *Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

(b) *Centro Enterobatteri Patogeni della Regione Veneto, UO Microbiologia, Ospedale di Treviso*

Salmonella rappresenta uno tra i principali agenti zoonotici responsabili di tossinfezioni alimentari. La distribuzione dei sierotipi isolati con maggior frequenza nell'uomo è variata nel tempo anche in modo considerevole.

In particolare la frequenza degli isolamenti di *S. Enteritidis* dall'uomo è andata velocemente aumentando a partire dalla fine degli anni '70 con un picco in Italia del 57,1% nel 1992. Nel periodo tra il 2000 e il 2002, invece, la percentuale di casi umani da *S. Enteritidis* è gradatamente diminuita fino al 20%; il Veneto, con una percentuale pari al 21,7% si pone al secondo posto tra le regioni italiane come entità di isolamenti segnalati al sistema Enter-net. La diminuzione dei casi umani riferibili a *S. Enteritidis* potrebbe essere correlata alle misure di profilassi messe in atto nel settore dell'allevamento avicolo considerando che le uova contaminate rappresentano la principale fonte d'infezione.

Relativamente alla distribuzione dei fagotipi quelli più frequentemente tipizzati a partire da ceppi isolati dall'uomo in Italia sono storicamente il PT4 e il PT1.

Dati relativi ai ceppi di Salmonella pervenuti al CEPVE (Centro Enterobatteri Patogeni della Regione Veneto) isolati da pazienti veneti dal 2003 al primo semestre 2004, e tipizzati presso il Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi, dimostrano che *S. Enteritidis* rappresenta il sierotipo più frequentemente isolato: 41% nel 2003 (totale isolamenti pari a 852) e 30,6% nel 2004 (totale isolamenti pari a 255). I fagotipi di *S. Enteritidis* maggiormente rappresentati sono: per il 2003 PT21 (21,6%), PT14B (19,2%) e PT8 (18,9%) e per il 2004 PT21 (30,8%) e PT1 (12,8%), PT14B si presenta con una frequenza sovrapponibile al PT8 e pari al 11,5%. Tale distribuzione è confermata anche per quanto riguarda i ceppi di *S. Enteritidis* isolati da animali (polli in particolare); i dati Enter-vet dimostrano infatti come dal 2002 al 2003 si è assistito ad un incremento significativo dei fagotipi PT14B, PT21, PT1 e PT8. Questi dati sono indice di una modifica nella distribuzione dei fagotipi di *S. Enteritidis*; distribuzione che assume caratteristiche peculiari anche dal punto di vista spaziale in quanto una più accurata valutazione permette di verificare come questi fagotipi non siano distribuiti uniformemente nel territorio del Veneto; si ritiene importante effettuare quindi ulteriori indagini che consentano di valutare le modalità con cui *S. Enteritidis* si diffonde nel territorio e di evidenziare eventuali correlazioni con la distribuzione dei fagotipi presenti a livello di allevamento avicolo.

P11. FOCOLAIO EPIDEMICO ASSOCIATO A CITROBACTER FREUNDII

Monica Staffolani (a), Stefano Fisichella (a), Federica Manganaro (b), Ida Luzzi (c)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche Sezione di Macerata

(b) Ospedale di Civitanova Marche

(c) Istituto Superiore di Sanità, Roma

In occasione di una cena a base di prodotti ittici in un ristorante di Civitanova Marche si è verificato un episodio di tossinfezione alimentare originariamente attribuito a Salmonella. Tra i 50 convitati erano presenti bambini, adulti e anziani per lo più residenti a Civitanova Marche di cui circa il 50% ha accusato entro 12 ore febbre, dolori addominali, vomito e diarrea acquosa con leucociti e sangue. La sintomatologia si è conclusa entro 2 giorni. Sono stati notificati 20 casi, e 9 pazienti, due o tre giorni dopo la cena, si sono recati presso l'ospedale di Civitanova dove i ceppi batterici sono stati isolati dalle feci e inviati al Centro di Riferimento Regionale. Tra questi 9 soggetti, 6 rientravano nella fascia di età 16-64 mentre 3 avevano più di 65 anni. Inoltre due di costoro sono risultati asintomatici: un commensale di 75 anni e un'addetta alle preparazioni alimentari di 29 anni. Le analisi condotte sugli alimenti non hanno permesso di isolare batteri sospetti ma è possibile escludere in linea di massima le ostriche, il dessert, le tagliatelle, le cozze e le vongole. Tuttavia tutti i pazienti con la sintomatologia hanno mangiato degli scampi conditi con una salsa a base di maionese e *ketchup*. Comunque si sospetta fortemente la trasmissione dell'agente patogeno per contaminazione degli alimenti dall'addetta alle preparazioni alimentari.

Dal punto di vista morfologico le colonie batteriche presentavano un aspetto chiaramente rugoso e si sono dimostrate ostinatamente autoagglutinanti. Alcuni terreni selettivi per Salmonella non hanno presentato l'aspetto tipico (terreno cromogeno), ma sulla maggior parte dei terreni le colonie risultavano tipiche (BGA, TSI). I test condotti con difficoltà a causa dell'autoagglutinazione presso il Centro e l'Ospedale di Civitanova hanno fatto inizialmente sospettare per un ceppo di *Salmonella Paratyphi A*, tuttavia i 9 ceppi sono stati inviati immediatamente anche a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità per la conferma. Qui le analisi biochimiche dubbie sono state confermate dall'analisi del rDNA 16S che ha rivelato la presenza di *Citrobacter freundii*.

Seconda sessione
Sanità Pubblica Veterinaria

P12. ISOLAMENTI DI *S. ENTERICA SUBSPECIES DIARIZONAE* SEROVAR 61:k:1,5,(7) DA OVINI

Stefano Bilei (a), Rita Tolli (a), Gina Di Giampietro (a), Maria Grazia Marrocco (a), Giuliana Terracciano (b), Simonetta Stefanelli (b), Sandra Gradassi (c), Antonia Ricci (d), Anna Maria Dionisi (e), Emma Filetici (e), Anna Paola Salinetti (a)

(a) IZS Lazio e Toscana, Roma; (b) IZS Lazio e Toscana, Dip. Interprovinciale di Pisa;

(c) IZS Lazio e Toscana, Dip. Provinciale di Grosseto; (d) IZS delle Venezie, Centro di

Referenza Nazionale per le Salmonellosi, Legnaro (PD); (e) Istituto Superiore di Sanità, Roma

In concomitanza con lo svolgimento del Piano di profilassi vaccinale obbligatorio per Bluetongue e del piano regionale di indennizzo relativo agli effetti indesiderati della vaccinazione, nel corso degli ultimi anni, si è registrato un aumento degli invii di campioni autoptici di pecore, agnelli e feti abortiti presso le strutture dipartimentali toscane dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. Contemporaneamente è aumentato il numero di isolamenti di ceppi di *Salmonella* tipizzati presso il Centro di Riferimento per gli Enterobatteri Patogeni dell'Istituto, come *Salmonella enterica subspecies Diarizonae* 61:k:1,5,(7). Tale sierotipo, originariamente isolato dai rettili, viene rinvenuto anche in animali a sangue caldo come l'uomo, dove è causa di infezioni di origine prevalentemente alimentare o come negli ovini, specie alla quale risulta essersi adattata, dove si isola anche da feti abortiti, placenti e agnelli morti a termine di gravidanza. Il suo ruolo patogeno pur non essendo ancora ben definito sembra essere associato a condizioni di stress e di immunodepressione. Da un'analisi retrospettiva sui database Enter-net Italia ed Enter-vet non è risultato alcun isolamento di tale serovar dall'uomo (1999-2004) e uno solo da ovino della provincia di Bologna (2002-2004). Il report 2002 "Salmonella" pubblicato dai CDC, Atlanta, che riporta la frequenza degli isolamenti negli USA nel decennio 1992-2002 da fonte umana, segnala 3 soli casi nel 1999 e un unico caso nel 2001 ma la stessa fonte riferisce, per il periodo 1967-1976, 27 isolamenti dall'uomo. Complessivamente negli anni 2002-2004 sono stati isolati da ovini e tipizzati, presso l'Istituto, 27 ceppi di *S. Diarizonae* 61:k:1,5,(7), di cui 11 da organi e tessuti di pecore adulte, 8 da feti abortiti e 8 da feci prelevate negli allevamenti già risultati positivi. I soggetti provenivano da 18 diversi allevamenti delle province di Pisa, Grosseto, Lucca, Massa, Pistoia, Arezzo e 1 di Latina. Nel corso dei tre anni l'incremento del numero è stato costante, 3 nel 2002, 10 nel 2003 e 14 nel 2004. Allo stato attuale non è possibile giustificare l'improvvisa comparsa del sierotipo e l'aumento del numero degli isolati a partire dal 2002 così come la sua insistenza nella sola regione Toscana. I ceppi sono stati sottoposti ad analisi dei profili di restrizione ottenuti mediante gel elettroforesi in campo pulsato (PFGE), utilizzando il software Bionumerics®. Dalla valutazione dei risultati appare che alcuni ceppi sono caratterizzati da un pulsotipo sovrapponibile, altri presentano profili differenti ma con percentuali di associazioni elevate superiori al 90%, altri ancora appaiono distanti da questi cluster principali. All'interno dei gruppi con omologia superiore al 90% è possibile riscontrare corrispondenze dal punto di vista epidemiologico ovvero di periodo, luogo e fonte di isolamento.

P13. ISOLAMENTO DI *ESCHERICHIA COLI* VEROCITOTOSSICI O157 E NON-O157 DA BOVINI MACELLATI IN ITALIA

Silvia Bonardi (a), Franco Brindani (a), Emanuela Foni (b), Stefano Morabito (c)

(a) *Dipartimento di Salute Animale, Università di Parma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Sede di Parma*

(c) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Gli stipti di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC) rappresentano una potenziale minaccia per il consumatore di determinati prodotti alimentari, principalmente carni bovine crude o insufficientemente cotte, latte crudo, formaggi a latte crudo, vegetali non lavati e contaminati da deiezioni animali. I ruminanti, e in particolar modo i bovini, fungono da serbatoio naturale dei VTEC, soprattutto del sierogruppo O157. Scopo del presente lavoro è lo studio dell'escrezione fecale di stipti VTEC appartenenti ai sierogruppi responsabili delle più gravi forme cliniche che contraddistinguono l'infezione umana (colite emorragica, Sindrome Emolitico Uremica), quali O157, O26, O103, O111 e O145.

In una prima fase (settembre 2001-giugno 2002), il contenuto intestinale di 145 bovini è stato sottoposto a semina su Enterohaemolysin agar (Oxoid, Basingstoke, UK), preceduta da arricchimento in TSB+vancomicina (8µg/l). Per il sierogruppo O157 è stata impiegata la tecnica di immuno-separazione magnetica (IMS) con Dynabeads anti-O157 (Dynal, Oslo, Norway) e semina su CT-SMAC. In un secondo tempo (ottobre 2003-giugno 2004), 106 campioni sono stati analizzati unicamente mediante IMS utilizzando Dynabeads anti-O157, O26, O103, O111 e O145. I complessi beads-microrganismi sono stati seminati su Enterohaemolysin agar e su Chromocult® TBX agar (Merk, Darmstadt, Germany). Inoltre è stato utilizzato il CT-SMAC per il sierogruppo O157 e il CT-RMAC, allestito con il ramnosio, per il sierogruppo O26. Le colture sospette, identificate il sistema API 20E® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sono state saggiate su monostrati di cellule Vero e, se positive, sottoposte alla ricerca dei geni di virulenza *vt1*, *vt2*, *eae*, *hly* mediante multiplex PCR.

Nella prima fase di campionamento 8 bovini (5,5%) sono risultati portatori di VTEC O157 e 7 soggetti (4,8%) di VTEC non-O157, precisamente O74, O91:H-, O109:H-, O116, O117, O110, ONT. I VTEC non-O157 erano privi del fattore di adesione alle cellule dell'epitelio intestinale e, pertanto, meno patogeni per l'uomo. Date le condizioni analitiche (semina su Enterohaemolysin agar), per il riconoscimento dei ceppi è risultato fondamentale il fattore fenotipico rappresentato dalla produzione di enteroemolisina. Nella seconda fase sono stati identificati 4 bovini (3,8%) positivi per VTEC O157, un soggetto (0,9%) per VTEC O26 e uno (0,9%) per VTEC O91:H-, responsabile di diarree umane non complicate, legatosi in maniera aspecifica alle beads anti-*E. coli* O103. I sierogruppi di maggior importanza clinica hanno presentato i seguenti geni di virulenza: *vt1*, *vt2*, *eae*, *hly* (5 VTEC O157), *vt2*, *eae*, *hly* (7 VTEC O157), *vt1*, *eae*, *hly* (1 VTEC O26), *vt2*, *hly* (2 VTEC O91:H-).

P14. VALUTAZIONI QUANTITATIVE DEL RISCHIO MICROBIOLOGICO DA ZONOSI: SONO EFFETTUABILI E UTILI IN ITALIA?

Luca Bucchini
Hylobates Consulting srl, Roma

Negli anni recenti vi è stato un forte impulso a basare le decisioni di sanità pubblica riguardanti le malattie trasmesse dagli alimenti su elaborazioni scientifiche quantitative, definite *Microbiological Risk Assessment* (MRA). Negli Stati Uniti, in Europa e a livello internazionale il paradigma della valutazione del rischio chimica è stato quindi applicato, con alcune modificazioni, all'ambito microbiologico. Numerose MRA sono state completate. Esiste dunque una motivazione per testare e applicare questo strumento anche in Italia, a livello nazionale o regionale, soprattutto a livello pubblico. Questa applicazione potrebbe risultare semplificata poiché parte del lavoro alla base delle MRA non dovrebbe essere ripetuta nel contesto italiano, perché ritenuto tipico delle caratteristiche del patogeno e dell'ospite umano. Per esempio, le informazioni relative alla dose infettiva o alle condizioni di crescita di un determinato microrganismo dovrebbero essere valide anche nel nostro Paese. Tuttavia, questa ipotesi deve essere testata considerando eventuali differenze locali che potrebbero rendere inutilizzabile il lavoro già svolto. Anche se molti elementi del modello fossero direttamente utilizzabili, resta da stabilire se in Italia sono disponibili quei dati specifici che devono necessariamente riflettere il contesto oggetto di studio. Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di esaminare le principali MRA di zoonosi effettuate dal gruppo di lavoro *ad hoc* della FAO/OMS (JEMRA) e dalle principali agenzie federali americane, valutare quali sezioni potessero essere applicate in Italia senza o con modifiche minori, identificare quali dati nazionali, regionali o locali sarebbero invece necessari, verificare se questi dati siano stati raccolti e quindi disponibili e, infine, considerare il valore in termini di sanità pubblica di queste valutazioni del rischio "localizzate". In primo luogo, è stato evidenziato che effettivamente alcune sezioni, particolarmente quelle relative alla identificazione e caratterizzazione del pericolo, possono essere utilizzate con modificazioni minori. In alcuni casi, però, le modificazioni richieste possono richiedere molto lavoro; inoltre, poiché, in particolare, la formazione della relazione dose-risposta richiede la formulazione di assunzioni, un valutatore italiano potrebbe considerarne alcune inaccettabili, rendendo inapplicabili i modelli. I principali dati locali necessari riguardano la prevalenza della contaminazione microbica e i consumi alimentari da parte della popolazione. I dati disponibili sono risultati limitati, risultando l'ostacolo principale. Infine, è stato riscontrato che alcune peculiarità nazionali della filiera agroalimentare e dei consumi indicano che l'applicazione "localizzata" di questi modelli potrebbe fornire indicazioni utili a livello nazionale e locale per regolamentazioni non solo basate sulla scienza, ma più vicine alla realtà e quindi efficaci.

P15. PRESENZA DI SALMONELLA SPP. NELL'ALLEVAMENTO DEL POLLO RIPRODUTTORE PESANTE

Raffaella Ceruti, Luigi Gavazzi, Viviana Ferrazzi, Daniele Gallazzi, Guido Grilli
Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi, Milano

La nostra ricerca si è proposta di evidenziare la presenza di *Salmonella* spp. nelle diverse fasi della filiera riproduttiva di una grande azienda avicola nazionale. A questo scopo sono stati controllati per 18 mesi 11 allevamenti di polli riproduttori pesanti, di consistenza variabile da 5.000 a 30.000 capi, e due incubatoi con capacità di 467.000 e 500.000 uova schiuse per settimana, rispettivamente. I campioni erano costituiti da: feci e visceri di polli deceduti (fegato e ciechi), tamponi ambientali degli incubatoi e delle celle stoccaggio uova, tamponi ambientali pre-accasamento dei riproduttori, mangime, uova "pipped", piumino delle camere di schiusa. Il monitoraggio è stato effettuato seguendo le linee guida del DL.vo 339/2000 per i campioni di feci e uova "pipped", mentre mangime, visceri, piumino e tamponi ambientali sono stati controllati con cadenze mensili. Per l'isolamento di *Salmonella* spp. è stata adottata la metodica ISO 6579 (1993) per le fasi di pre-arricchimento e arricchimento selettivo; la metodica Vidas (validata AFNOR- attestata BIO 12/1-04/94) per la seconda parte dell'analisi; la metodica AFNOR TEC 05/1-04/92 e ISO 6579 per l'isolamento in piastra; la metodica AOAC 978.24 per la conferma biochimica, seguita dalla tipizzazione sierologica di gruppo.

In totale sono stati controllati 2.618 campioni, di cui 1.654 provenienti dagli allevamenti e 964 dai due incubatoi. Solo 38 ceppi sono stati isolati in allevamento e precisamente: da feci 22 *S. Hadar*, e 2 *S. Muenchen* (gruppo C2), 1 *S. Infantis* (C1) e 2 *S. Coeln* (B). Dai visceri sono stati isolati 7 ceppi appartenenti al gruppo C2 e dalle celle di stoccaggio delle uova 2 ceppi di gruppo C2 e 2 ceppi di gruppo F. Tutti i campioni di mangime e i tamponi pre-accasamento sono risultati negativi. Dagli incubatoi sono stati isolati 141 ceppi: 21 appartenenti al gruppo C1, 81 al gruppo E, 2 a F e 36 a G. Più inquinati risultavano essere piumino (85/214), tamponi ambientali (46/389) e uova "pipped" (10/361).

Il rigido rispetto delle norme di biosicurezza, il controllo delle materie prime e dei mangimi finiti, nonché la vaccinazione contro *Salmonella pullorum-gallinarum* e *Salmonella Enteritidis*, hanno permesso di contenere gli isolamenti di salmonelle nella filiera da noi controllata.

PRIMI ISOLAMENTI DI *ESCHERICHIA COLI* O157 IN RUMINANTI SELVATICI IN ITALIA

Gabriella Conedera (a), Marco Bregoli (b), Luciano Iob (a), Claudio Pasolli (b),
Mariarosa Bellino (a), Stefano Morabito (c), Rosangela Tozzoli (c)

a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Pordenone

b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Area Territoriale di Trento

c) Istituto Superiore di Sanità, Roma

I ruminanti domestici, in particolare bovini e ovini, sono considerati il principale serbatoio di *Escherichia coli* O157 produttore di Verocitotossine (VTEC O157). È ancora poco noto il ruolo dei ruminanti selvatici, relativamente ai quali vengono qui riportati i risultati di un'indagine effettuata nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero della Salute (RF IZS VE 01/00). Nel periodo giugno 2002-maggio 2004 sono stati analizzati 522 campioni di contenuto intestinale di capriolo (*Capreolus capreolus*), cervo (*Cervus elaphus*) e camoscio (*Rupicapra rupicapra*) prelevati in sede di necropsia presso l'IZS di Pordenone e di Trento da soggetti morti o abbattuti nei territori di competenza: 107 caprioli, 3 cervi e 24 camosci originavano dalla provincia di Pordenone, 188 caprioli e 200 cervi dalla provincia di Trento. La ricerca di *E. coli* O157 è stata effettuata con metodica basata sull'immunoseparazione magnetica analizzando 1g di contenuto intestinale. Sono risultati positivi per VTEC O157 quattro campioni, appartenenti ad 1 (0,3%) dei 295 caprioli esaminati e a 3 (1,5%) di 203 cervi; sono risultati negativi 24 camosci. I quattro stipiti isolati erano positivi in PCR per i geni *vt2* ed *eae*; i profili in PFGE risultavano tutti differenti tra loro. Le positività riscontrate nel cervo erano riferibili a soggetti di età adulta provenienti sia dal settore occidentale che orientale della provincia di Trento. La positività riscontrata nel capriolo riguardava un soggetto adulto rinvenuto morto in provincia di Pordenone. Nell'ambito di un'ulteriore indagine condotta per due mesi nella zona di rinvenimento del capriolo positivo, sono stati raccolti 17 campioni di feci di capriolo e 18 di cervo; di questi, un campione fecale di cervo è risultato positivo per VTEC O157, con isolamento di uno stipite identico a quello del capriolo per caratteristiche genotipiche e pattern in PFGE.

La presenza di VTEC O157 nei ruminanti selvatici merita ulteriori approfondimenti, considerando che potrebbe esservi mantenimento e circolazione del microrganismo in ambito selvatico ma anche la sua acquisizione in pascoli utilizzati da ruminanti domestici.

Il potenziale rischio di infezione da VTEC O157 per contaminazione fecale dell'ambiente e delle carni di selvaggina non va sottovalutato, ricordando che casi umani per consumo di carni di cervo sono già stati segnalati negli Stati Uniti e considerando alcune criticità, anche di tipo normativo, relative al controllo sanitario delle carni di selvaggina.

P16. POLIMORFISMI DEL GENE DELLA PROTEINA PRIONICA E SUSCETTIBILITÀ ALLA SCRAPIE IN RAZZE OVINE E CAPRINE ITALIANE

Michela Conte, Luisella Morelli, Michele Angelo Di Bari, Giovanni Antonucci, Barbara Chiappini, Elena Esposito, Consiglia Parisi, Paolo Frassanito, Shimon Simson, Romolo Nonno, Gabriele Vaccari
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel gene della proteina prionica (PrP) ovina sono stati descritti numerosi polimorfismi, alcuni dei quali in grado di influenzare la suscettibilità/resistenza alla scrapie. I polimorfismi più rilevanti sono quelli ai codoni 136, 154 e 171. In particolare, al codone 136 il gene può codificare per Alanina (A) o per Valina (V), al codone 154 per Arginina (R) o Istidina (H), al codone 171 per Arginina (R), Glutamina (Q) o – più raramente – Istidina (H). Tali polimorfismi generano 5 principali alleli (ARR, ARH, AHQ, ARQ e VRQ).

Nel presente lavoro si riportano i risultati di un progetto di ricerca mirato all'individuazione dei polimorfismi del gene della PrP nelle più importanti razze ovicaprine italiane e allo studio del loro ruolo nell'influenzare la suscettibilità genetica alla scrapie. Sono state studiate 56 pecore di razza Sarda, 16 di razza Comisana e 20 capre di razza Ionica affette da scrapie, assieme ad animali clinicamente sani utilizzati come controlli, provenienti dagli stessi greggi.

Nella razza Sarda, la scrapie è altamente correlata con l'omozigosi al codone 171 per Q, infatti tutti gli animali affetti hanno mostrato il genotipo ARQ/ARQ o ARQ/AHQ. Nella razza Comisana, al contrario di quella Sarda, è stato osservato l'allele VRQ (allele associato in molti paesi europei ad un'elevata suscettibilità alla malattia). Anche in questa razza tuttavia la scrapie è altamente correlata all'omozigosi per l'allele ARQ.

Nelle capre di razza Ionica sono stati identificati 6 differenti siti polimorfici ai codoni 37, 110, 143, 154, 222 e 240 e l'omozigosi per H al codone 143 è stata associata ad un'elevata suscettibilità alla scrapie. Le frequenze alplotipiche, stimate con l'algoritmo "Expectation-Maximization" mediante il software Arlequin indicano la presenza di due specifici alplotipi che sembrano influenzare la suscettibilità alla scrapie.

I nostri dati indicano una forte correlazione fra l'omozigosi Q/Q al codone 171 e la scrapie nelle pecore di razza Sarda e Comisana. Inoltre lo studio sulle capre aggiunge preziose informazioni sulla suscettibilità genetica di questa specie, sinora poco studiata. La limitata variabilità del gene della PrP nelle principali razze ovine italiane, così come la bassa frequenza dell'allele ad alto rischio VRQ, costituiscono elementi favorevoli in vista dei programmi di selezione genetica per la resistenza alla scrapie richiesti dalla Comunità Europea.

P17. PATOGENESI E SUSCETTIBILITÀ GENETICA IN PECORE DI RAZZA SARDA INFETTATE SPERIMENTALMENTE CON LA SCRAPIE: RISULTATI PRELIMINARI

Claudia D'Agostino (a), Renata Borroni (a), Luigi De Grossi (b), Francesca Rosone (b), Gabriele Vaccari (a), Stefano Marcon (a), Francesco Giordani (b), Nadia Palazzini (a), Daniela Calciolo (b), Romolo Nonno (a), Annarita Pifferi (b), Fabio Acocella (c), Nazzareno Renzo Brizioli (b)

(a) Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma; (c) Veterinario Libero Professionista, Milano

Negli ovini il gene della PrP presenta polimorfismi che condizionano la suscettibilità/resistenza alla scrapie e la sua patogenesi. Quelli più rilevanti sono situati al codone 136, che codifica per Alanina (A) o Valina (V), 154 per Arginina (R) o Istidina (H) e 171 per Arginina (R), Glutamina (Q) o Istidina (H). La suscettibilità alla scrapie è massima nei soggetti VRQ/VRQ e ARQ/ARQ, mentre gli omozigoti ARR/ARR appaiono resistenti. L'UE ha pertanto individuato nella selezione genetica la base della strategia di gestione della scrapie in Europa.

Questo studio si pone l'obiettivo di indagare la patogenesi della scrapie e di valutare la suscettibilità genetica alla malattia ai fini della prossima applicazione dei piani di selezione.

Centocinquantanove pecore di razza Sarda portatrici dei più frequenti genotipi sono state infettate sperimentalmente, per via orale (os), o per via intracerebrale (ic), con la scrapie.

Dai soggetti infettati per os e sacrificati ad intervalli di tempo predeterminati, sono stati prelevati campioni di numerosi tessuti linfatici, sia associati al tratto digerente (gut-associated lymphoid tissues o GALT) che non (non GALT). I tessuti linfatici e l'obex sono stati analizzati mediante immunostochimica e Western blot per la ricerca della PrPSc.

I primi accumuli di PrPSc si osservano nel GALT (tonsilla, linfonodo retrofaringeo, placche digiunali di Pejer) dei soggetti ARQ/ARQ infettati per os, 3 mesi dopo l'infezione (p.i.). A 9 mesi dall'infezione la PrPSc è presente in alcuni tessuti non GALT, mentre a 16 mesi pressoché tutti i distretti linfatici risultano interessati dall'accumulo di PrPSc. A 20 mesi dall'infezione nessun soggetto inoculato per os ha ancora manifestato sintomatologia nonostante la presenza di PrPSc sia documentabile già a 12 mesi nell'obex.

Tra i soggetti infettati per via intracerebrale gli omozigoti ARQ/ARQ hanno sviluppato la malattia con tempi di sopravvivenza compresi tra 417 e 479 giorni.

I risultati sinora ottenuti indicano che: 1) nella razza Sarda – nella quale manca l'allele VRQ – il genotipo ARQ/ARQ risulta il più suscettibile; 2) i primi segni di infezione sono evidenziabili a livello del GALT già 3 mesi p.i.; 3) l'accumulo di PrPSc nell'obex è evidenziabile precocemente rispetto alla comparsa della sintomatologia clinica; 4) negli ovini portatori di almeno un allele ARR infettati per os non si osserva alcun segno di infezione.

I risultati preliminari ottenuti supportano pertanto la validità dei piani di selezione genetica indicati dall'UE per il controllo della scrapie ovina.

P18. DIFFUSIONE E TRASFERIBILITÀ DELLE POLIRESISTENZE IN SALMONELLA SPP. NELLE FILIERE SUINICOLA E AVICOLA

Anna Dal Vecchio (a), Caterina Mammina (b), Antonino Nastasi (c),
Giovanni Loris Alborali (d), Mirella Pontello (a)

(a) Istituto di Igiene, Università degli Studi di Milano; (b) Dipartimenti di Igiene e
Microbiologia G. D'Alessandro; (c) Dipartimento di Sanità Pubblica, Firenze; (d) Istituto
Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Ceppi di *Salmonella* spp. che presentano multi-resistenze sono ormai diffusi sia nei Paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo. Nei Paesi sviluppati è accertato che nella maggior parte dei casi questi ceppi acquisiscono le resistenze nell'ospite animale prima di trasmetterle agli uomini tramite la catena alimentare. L'ampio uso degli antibiotici in zootecnia e in terapia umana ha contribuito e contribuisce tuttora ad aumentare la quota di resistenza in un numero rilevante di patogeni favorendo la selezione dei batteri multi-resistenti. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di monitorare le antibiotico-resistenze dei ceppi di *Salmonella* isolati dalla filiera avicola e suinicola (feci, carcasse e ambiente), e di verificare l'eventuale trasferibilità di queste ad un ceppo recettore di *Escherichia coli* K12J5 (lac+; Rif R).

I 118 ceppi di *Salmonella* spp. sono stati isolati dalle seguenti fonti: suino, 90; avicoli (pollo, tacchino, uova), 18; ambiente (mangimi e lettiera), 10.

Il sierotipo più frequentemente identificato è stato *S. Typhimurium* (33% del totale, 40% nella filiera suinicola); nel 17% dei casi (21% nei suini) è stato isolato il sierotipo caratterizzato dalla formula antigenica 4,5:i:- (variante monofasica di *S. Typhimurium*?) di recente segnalato in diversi paesi europei (isolamenti da animali).

I ceppi sono stati testati per la loro sensibilità a 11 antibiotici (oltre alla Rifampicina) secondo la metodica Kirby-Bauer; gli stipiti portatori di due o più resistenze sono stati esaminati per la loro capacità a trasferire le resistenze al ceppo recettore K12J5, secondo le procedure di coniugazione pubblicate in letteratura. Gli antibiotici utilizzati per la verifica del passaggio delle resistenze sono stati: Ampicillina (Am), Tetraciclina (Te), Streptomina (S) e il Cloramfenicolo (C).

Dei 118 ceppi sottoposti ad antibiogramma, 20 erano totalmente sensibili agli antibiotici testati, soltanto 10 presentavano una sola resistenza (TE, 9/10), mentre i rimanenti 88 esibivano due o più resistenze, raggruppabili in 32 pattern differenti. Gli spettri più frequenti sono stati: AmSSssTe (16/88 = 18,2%) e NaAmSSssTe (11/88 = 12,5%). Degli 88 ceppi considerati idonei per lo studio del passaggio delle resistenze, soltanto in 25 si è verificato il passaggio delle poliresistenze al recettore e in quattro di questi ceppi il passaggio delle resistenze ha dato due differenti antibiotipi finali. La resistenza all'Ampicillina, rilevata per 23 stipiti di *Salmonella*, è sempre stata trasferita al recettore, mentre quella alla tetraciclina è stata trasferita in 18 casi su 25. Infine i pattern di resistenza più frequentemente acquisiti dallo stipite recettore sono stati: Am (24%), AmTe (20%), AmSssTeTmp (13%).

P19. PREVALENZA DI SALMONELLA SPP. NELLA FILIERA SUINA

Lucia Decastelli (a), Daniela Manila Bianchi (a) Morena Martorana (a),
Sara Lomonaco (b), Maria Teresa Bottero (b), Tiziana Civera (b)

(a) IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; (b) Dipartimento di Patologia animale, Torino

Il lavoro si propone di valutare la prevalenza di *Salmonella* spp. nella filiera suina in una zona del Piemonte ad alta attitudine produttiva (ASL 17).

Tra marzo-agosto 2004 sono stati campionati 16 allevamenti suini affluenti a macelli presenti sul territorio regionale; effettuando i seguenti prelievi:

- *allevamento*: da tre box si è proceduto al prelievo di feci ottenendo tre campioni pool;
- *macello*: sui suini si è proceduto al prelievo di linfonodi ileocecali e tonsille, e all'effettuazione di tamponi superficiali secondo le modalità previste dalla Dec. 2001/471/CE. Sono stati effettuati prelievi di acqua dalla vasca di scottatura.

Le analisi microbiologiche sono state effettuate attraverso la procedura operativa standard. Sulle colonie sospette si è effettuata una multiplex PCR (4 coppie di *primers*) in grado di amplificare il gene *invA* codificante un fattore di patogenicità per *Salmonella* spp. (Rahn *et al.*, 1992); e i geni *rfbJ*, *fliC*, *fljB* per gli antigeni somatici e flagellari di *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Lim *et al.*, 2003).

Le colonie confermate in PCR sono state sierotipizzate mediante anticorpi poli e monoclonali.

In tre allevamenti (18,75%) si sono isolati ceppi di *Salmonella* spp. All'interno di un allevamento, due dei tre box campionati contenevano animali eliminatori, mentre negli altri casi un solo box è risultato positivo.

In sede di macellazione, in animali appartenenti a 7 allevamenti (43,75%) è stata isolata *Salmonella* spp. a livello linfonodale. Nessuno di questi lotti eliminava *Salmonella* spp. con le feci.

Si sono riscontrati 7 casi di positività (43,75%) per le tonsille; due comprendevano animali eliminatori di *Salmonella* spp. con le feci e in 4 casi c'è stato il contemporaneo isolamento dai linfonodi.

I tamponi superficiali hanno permesso di isolare *Salmonella* spp. in 5 casi. L'acqua di scottatura è risultata positiva in 4 casi: tre di questi hanno interessato un unico macello.

Il sierotipo più frequentemente isolato è *S. Typhimurium*. Si sottolinea la presenza del nuovo sierotipo non ancora denominato 4,5,12:i:-.

Si può affermare che la presenza di *Salmonella* spp. all'interno della filiera suina è un rischio reale; il macello risulta essere un punto critico della catena produttiva contribuendo alla diffusione attraverso la contaminazione crociata delle carcasse.

Finanziamento Regione Piemonte DGR n. 69-8040 del 16/12/2002 e Determina Dirigenziale n. 104 del 21/07/2003

P20. ANALISI MOLECOLARE DI ISOLATI DI SCRAPIE NATURALE PROVENIENTE DA DIVERSI PAESI EUROPEI E CONFRONTO CON LA BSE OVINA SPERIMENTALE

Elena Esposito (a), Stefano Marcon (a), Gabriele Vaccari (a), Claudia Cartoni (a), Paolo Frassanito (a), Shimon Simson (a), Renata Borroni (a), Michele Angelo Di Bari (a), Thierry Baron (b), Moira Bruce (c), Ciriaco Ligios (d), Romolo Nonno (a)
(a) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*; (b) *Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments, Unité Virologie-ATNC, Lione*; (c) *Institute for Animal Health, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh*; (d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari*

Nonostante i recenti progressi nella comprensione delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST), alcune problematiche ancora prive di risposta continuano ad incidere sulla capacità delle Autorità Sanitarie di far fronte a queste malattie. Tra queste un posto di primo piano spetta alla discriminazione dei ceppi di EST. La comparsa della BSE ha infatti evidenziato come esistano diversi ceppi di EST con differenti proprietà patogenetiche, alcuni dei quali in grado di infettare sia gli animali che l'uomo. Ad oggi le conoscenze sull'entità della variabilità dei ceppi di EST circolanti in Europa è ancora molto limitata. Questo sottolinea l'urgenza di sviluppare approcci analitici per la sorveglianza delle EST dei ruminanti utili alla caratterizzazione dei ceppi più comuni presenti in Europa e alla identificazione di ceppi emergenti. La caratterizzazione biochimica della PrP^{Sc} appare oggi uno strumento promettente per poter tipizzare gli isolati di EST nei piccoli ruminanti ma, soprattutto, per poter attuare una sorveglianza rispetto alla paventata presenza della BSE nella specie ovina. È noto infatti che la PrP^{Sc} del bovino e della pecora infettati dalla BSE presentano proprietà distinte da quelle osservate nella PrP^{Sc} nei casi di scrapie. Recentemente abbiamo analizzato le caratteristiche molecolari di diversi casi di scrapie italiani, dimostrando che questi sono notevolmente simili tra loro e molto ben distinguibili dai casi di BSE ovina (Nonno *et al. J Clin Microbiol*, 2003). Con lo scopo di indagare la variabilità molecolare della scrapie in Europa, abbiamo analizzato, tramite la tecnica del Western blotting, 15 ulteriori casi italiani di scrapie, 10 inglesi e 4 casi provenienti dalla Francia. Sfruttando il legame selettivo dell'anticorpo P4 per un epitopo della PrP diversamente conservato, dopo digestione, nei casi di scrapie e di BSE e analizzando i valori delle glicoforme della PrP^{Sc}, abbiamo dimostrato che gli isolati di scrapie non solo possono essere raggruppati in diverse categorie, indipendentemente dal genotipo dell'animale, ma sono anche tutti distinguibili dalla BSE ovina. Questi risultati da una parte confermano quanto possa essere vantaggiosa l'analisi molecolare della PrP^{Sc} al fine di ottenere una evidente discriminazione della BSE dalla scrapie, dall'altra suggeriscono che questo tipo di analisi potrebbe rappresentare un possibile approccio per la caratterizzazione dei ceppi di scrapie. Infine, è da tener presente che informazioni determinati sulle caratteristiche degli isolati analizzati deriveranno dagli studi di tipizzazione biologica mediante trasmissione sperimentale in modelli animali da laboratorio, attualmente in corso.

P21. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ IGIENICO-MICROBIOLOGICA DI MOLLUSCHI BIVALVI E DI PESCI DI ACQUACOLTURA

Incoronata Fanelli, Lorenzo Torosantucci, Giancarlo Ripabelli, Michela Lucia Sammarco, Guido Maria Grasso

Dipartimento di Scienze per la Salute, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Nell'ambito di un progetto multicentrico, nel periodo settembre 2003-luglio 2004, sono stati analizzati, per la ricerca dei parametri di contaminazione (carica microbica, coliformi totali, coliformi fecali, *E. coli*), di *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp., un totale di 206 campioni di prodotti ittici prelevati presso due impianti di acquacoltura situati nelle regione Molise e comprendenti 100 campioni di cozze (48,5%), 62 di spigole (30,1%) e 44 di orate (21,4%). Globalmente, *Vibrio* spp. è risultato presente nel 75,7% dei campioni mentre *Salmonella* spp. è risultata sempre assente. Sono risultate contaminate da *Vibrio* soprattutto le orate (81,8%), anche se la differenza rispetto alle spigole (74,2%) e alle cozze (74,0%) non è significativa ($p = 0,568$, test chi-quadrato di Pearson). Per quanto riguarda gli indici di contaminazione (carica microbica, coliformi totali, coliformi fecali, *E. coli*) utilizzati per valutare la qualità igienico-sanitaria dei prodotti ittici, le cozze sono globalmente il prodotto maggiormente contaminato (coliformi totali: $4852,4 \pm 17404,9$ mpn/100g; coliformi fecali: $1263,8 \pm 2861,9$; *E. coli*: $957,8 \pm 2474,6$; $p < 0,05$; procedura ANOVA univariata). Per quanto concerne i valori medi degli indici di contaminazione in relazione alla presenza o assenza di *Vibrio* spp., si osserva una associazione tra bassi livelli di conta di tutti i parametri di contaminazione e presenza di questo microrganismo, anche se una significatività statistica è raggiunta solo per coliformi totali ($p < 0,05$; test T per campioni indipendenti); per i coliformi fecali e *E. coli* i valori sono vicini alla significatività ($p = 0,09$).

Non sono molti i lavori scientifici che hanno riguardato la prevalenza di *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. in campioni di prodotti dell'industria dell'acquacoltura. Il nostro studio è, inoltre, il primo che considera insieme i microrganismi e confronta i loro isolamenti con i classici indicatori di contaminazione, utilizzati per la valutazione della qualità igienico-sanitaria dei prodotti ittici. Tale confronto ha mostrato, per quanto concerne *Vibrio* spp., una associazione inversa, con bassi livelli di contaminazione associati ad una elevata presenza di questo microrganismo. Gli aspetti igienico-sanitari riguardano soprattutto: la necessità di sottoporre a cottura adeguata i prodotti ittici; la necessità di porre la massima attenzione per evitare la contaminazione crociata; la necessità di affiancare ai parametri tradizionali di qualità igienico-sanitaria dei prodotti ittici (carica microbica, colimetria totale e fecale, *E. coli*) anche indicatori che tengano conto della presenza di patogeni ad habitat idrico/ambientale, scarsamente individuati dagli indici fino ad ora utilizzati.

P22. PRESENZA DI YERSINIA SPP. E SALMONELLA SPP. IN LAGOMORFI SELVATICI SOGGETTI A PRELIEVO VENATORIO

Viviana Ferrazzi, Daniele Gallazzi, Guido Grilli
Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi, Milano

Tenuto conto che le carni di piccola selvaggina soggetta a prelievo venatorio non sono sottoposte ad alcun tipo di controllo sanitario e possono essere liberamente consumate, abbiamo indagato la presenza di *Yersinia* spp. e *Salmonella* spp., ritenuti comuni agenti zoonosici in lagomorfi selvatici quali Lepre comune (*Lepus europaeus*), Lepre bianca (*Lepus timidus*), Coniglio selvatico (*Oryctolagus cuniculus*) e Silvilago (*Sylvilagus floridanus*). Nel periodo gennaio 2003-agosto 2004 sono stati analizzati 210 soggetti rinvenuti morti o catturati nell'ambito di prelievi venatori o piani di abbattimento prestabiliti: 26 lepri comuni di provenienza lombarda, 21 lepri bianche abbattute in Trentino Alto Adige, 54 silvilaghi della provincia di Varese e del Parco del Ticino e 109 conigli cacciati nella provincia di Bergamo. Tutti i capi sono stati sottoposti ad accurata indagine necroscopica e, ad eccezione di *L. timidus*, batteriologica. Per la ricerca di *Salmonella* spp. i campioni ciecali sono stati seminati in Buffered Peptone Water per 24 h a 37 °C con passaggi in Rappaport-Vassiliadis Broth per 24 h a 41 °C e Selenite Cystine Broth per 24 h a 37 °C, quindi semina su Hektoen Agar e XLD Agar (24 h a 37 °C). Le colonie sospette sono state sottoposte al test della fluorescenza (MUCAP TEST) e alla sieroaagglutinazione rapida con antisieri polivalenti specifici di gruppo. Per la ricerca di *Yersinia* spp. il campione intestinale è stato seminato in Yersinia PBS Broth, incubato a 4° C per 21 giorni e successivamente seminato in Yersinia selective agar (CIN Agar, Biolife) sia direttamente che previo trattamento in soluzione alcalina di KOH al 10%. Le colonie sospette sono state identificate con il micrometodo API 20E (BioMerieux). Non sono state riscontrate lesioni riferibili a *Salmonella* spp., assente anche a livello batteriologico in tutti i lagomorfi considerati. In 19 silvilaghi si sono riscontrati caratteristici focolai necrotici nei tessuti linfatici intestinali (*sacculus rotundus*, *appendix*) da sospetta pseudotubercolosi. Solo in 7 di questi soggetti però gli esami batteriologici hanno confermato la presenza di *Y. Pseutotuberculosis*, a riprova dell'andamento cronico dell'infezione nei selvatici, con possibile autosterilizzazione delle lesioni iniziali. L'isolamento di *Y. Pseutotuberculosis* nel silvilago, e la grande pericolosità di altri agenti zoonosici dei lagomorfi (*in primis: Francisella tularensis*) consigliano l'applicazione di particolari cautele durante l'eviscerazione e la manipolazione delle carcasse.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *E. COLI* O157 IN ALLEVAMENTI BUFALINI DELL'ITALIA MERIDIONALE: RISULTATI PRELIMINARI

Giorgio Galiero (a), Gabriella Conedera (b), Domenico Alfano (a), Alfredo Caprioli (c)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Fuorni (Salerno)
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Cordenons (Pordenone)
(c) Istituto Superiore di Sanità, Roma

E. coli O157 produttore di verocitotossine (VTEC O157) può essere causa di gravi patologie umane. Il ruolo di bovini e ovini quali principale serbatoio animale di VTEC O157 è stato dimostrato da numerosi studi, mentre è ancora poco noto quello della bufala mediterranea (*Bubalus bubalis*) la quale viene intensamente allevata soprattutto nei territori dell'Italia meridionale per la produzione della rinomata mozzarella nonché della carne, il cui consumo è in forte espansione. Vengono qui riportati i risultati preliminari di un'indagine condotta in allevamenti bufalini nell'ambito della ricerca IZS VE 01/00 finanziata dal Ministero della Salute. Lo studio per l'isolamento di *E. coli* O157 è stato eseguito esaminando campioni di 1 g di feci con metodica basata sull'immunoseparazione magnetica.

Nel periodo settembre 2002-ottobre 2003, sono stati controllati 65 allevamenti bufalini di varie dimensioni, siti in Campania. Campioni fecali sono stati prelevati da capi di 6-18 mesi, età alla quale nel bovino si riscontra la massima prevalenza di portatori fecali. VTEC O157 è stato isolato da 42 (14,5%) dei 289 animali esaminati, appartenenti a 21 (32,3%) delle aziende controllate. La prevalenza media di animali positivi nei singoli allevamenti variava dal 35,6% al 15,3%. L'analisi PCR dei 42 ceppi isolati mostrava la presenza del gene *vt2* in 39, dei geni *vt1+vt2* in 3 e del gene *eae* in tutti.

I risultati preliminari di questa indagine indicano che anche il bufalo può essere considerato un reservoir naturale di VTEC O157: le percentuali di escrezione fecale riscontrate sono sovrapponibili a quelle osservate nel bovino in Italia e in altri Paesi. Ulteriori studi si rendono necessari al fine di valutare l'impatto della specie bufalina sulla possibile contaminazione da *E. coli* O157 dell'ambiente e delle filiere produttive del latte e della carne, nell'ottica di un controllo integrato di processo, al fine di garantire, attraverso una corretta gestione del rischio, un appropriato livello di sicurezza del consumatore.

P23. INDAGINE SULLA PRESENZA DI ALCUNI PATOGENI ENTERICI NEI BANCHI FRIGORIFERI PER ALIMENTI

Valerio Giaccone (a), Lorenzo Vercellotti (b), Ivana Defabiani (b), Marcello Ferioli (c), Pietro Ferrato (d), Riccardo Miotti Scapin (b)

(a) *Dipartimento di Sanità pubblica, Università degli Studi di Padova*; (b) *Dipartimento di Prevenzione ASR 11 Vercelli*; (c) *Laboratorio EptaNord, Conselve (PD)*; (d) *Assicurazione Qualità, UNICOMM srl, Malo (VI)*

In Europa, come così negli USA, i casi di malattia alimentare sono in continuo, progressivo aumento. La pulizia delle superfici e degli utensili di lavoro è essenziale, in fase di produzione e vendita degli alimenti, soprattutto se di origine animale. I diversi patogeni enterici, inoltre, rivelano notevoli capacità di adattamento; alcuni *autori* hanno dimostrato che batteri quali *Salmonella Enteritidis*, *S. Aureus* e *Campylobacter jejuni* sono in grado di aderire anche alle superfici di lavoro in acciaio inossidabile, e di sopravvivervi. Quanto sopra ha indotto gli *autori* a monitorare la situazione esistente su particolari superfici che vengono sovente a contatto con gli alimenti, ma che spesso non sono prese in considerazione: i banchi di esposizione refrigerati.

Sono stati effettuati 250 prelievi con tampone sterile, dalle superfici metalliche espositive di banchi frigoriferi di 25 punti di vendita (per lo più ipermercati), in prossimità delle griglie di aspirazione dell'aria. Dopo il prelievo, i tamponi sono stati posti a temperatura di refrigerazione e inviati al laboratorio, per la ricerca qualitativa di *Salmonella* spp., *Listeria* spp., Enterobacteriaceae in genere e di una flora Gram positiva generica, come indice di inquinamento ambientale.

Salmonella spp. è risultata costantemente assente; il 20% dei campioni è risultato positivo per una microflora composta di enterobatteriacee, tra le quali si sono potuti identificare ceppi di *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* e un ceppo di *Yersinia enterocolitica*. Isolati, inoltre, 5 ceppi di *Listeria* spp., di cui 3 identificati come *L. innocua* e 2 come *L. monocytogenes*. Tutti i ceppi citati sono stati isolati in banchi di vendita di prodotti di gastronomia

Sebbene i risultati ottenuti sinora si riferiscano a un numero di campioni relativamente limitato, appare evidente che in alcune occasioni, e nonostante gli interventi di sanificazione, batteri alteranti o patogeni con gli alimenti possono aderire alle superfici metalliche e sopravvivere, trasformando la superficie stessa in un possibile veicolo di cross-contaminazione. Il riscontro di *Listeria* spp. nei banchi frigoriferi dei prodotti di gastronomia, inoltre, può essere considerato un aspetto quasi "fisiologico", tenuto conto del fatto che in detti banchi sono presenti, di regola, anche prodotti alimentari che per loro natura e modalità di produzione possono facilmente risultare inquinati da listerie (come i prodotti a base di latte, freschi o stagionati che siano).

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *CAMPYLOBACTER* SPP. NELLA FILIERA AVICOLA

Maria Ausilia Grassi (a), Alessandra Dalmasso (a), Maria Rosa Daziano (a),
Lucia Decastelli (b)

(a) *Facoltà di Medicina Veterinaria, Grugliasco*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

La ricerca si è proposta di monitorare la presenza di *Campylobacter* termofili nella filiera avicola, al fine di valutarne l'incidenza in allevamento, sulle carcasse nonché la prevalenza delle specie di maggior rilevanza sanitaria.

Sono stati monitorati in totale 15 allevamenti siti in 5 differenti Distretti della Regione Piemonte: di questi, 1 con caratteristiche "familiari", 13 di tipo aziendale e 1 di tipo biologico.

Sono stati analizzati in totale 1083 campioni così distribuiti: 746 tamponi cloacali, 318 campioni di feci, 23 carcasse.

Il protocollo prevedeva, presso gli allevamenti, l'esecuzione di tamponi cloacali e prelievo di feci da lettiera. Su tali campioni la ricerca di *Campylobacter* è stata eseguita secondo la metodica FDA, mentre per le carcasse, previo prelievo distruttivo, in doppio dalla muscolatura di petto e coscia, è stata utilizzata la tecnica ELFA (VIDAS).

Mediante PCR è stato possibile confermare l'appartenenza al genere *Campylobacter* e identificare le seguenti specie: *C. coli*, *C. jejuni*, *C. foetus* e *C. upsaliensis*.

La presenza di *Campylobacter* termofili è stata evidenziata in pressoché tutte le realtà campionate; solamente i campioni prelevati negli allevamenti di una ASL, caratterizzati da elevati standard igienici, hanno dato esito costantemente negativo. Le positività nei restanti allevamenti non è mai risultata superiore al 17% inoltre la presenza del microrganismo non rappresenta un problema sanitario per gli avicoli. Sulle carcasse le percentuali di positività sono risultate più elevate (34,8%).

I risultati da noi ottenuti indicano *C. coli* come specie prevalente relativamente ai tamponi cloacali (51,4%) e alle feci (53,7%), mentre per le carcasse si è evidenziata una netta prevalenza di *C. jejuni* (100%). In 32 campioni (20 tamponi cloacali, 11 feci e 1 carcassa) risultavano presenti sia *C. jejuni* sia *C. coli*.

I risultati ottenuti confermano i dati presenti in bibliografia e sottolineano come elevati livelli di igiene siano in grado di controllare la presenza del microrganismo in allevamento. In merito alle elevate positività delle carcasse è verosimile collegarle alle differenti fasi della macellazione le quali possono rappresentare una importante fonte di cross-contaminazione; riteniamo pertanto auspicabile, nell'ottica della tutela igienico sanitaria dei consumatori, intensificare i controlli nelle differenti linee di macellazione al fine di individuare le criticità e quindi ridurre o quantomeno contenere le positività delle carcasse.

PRESENZA DI *YERSINIA* SPP. E *SALMONELLA* SPP. IN CONIGLI DA CARNE

Guido Grilli, Anna Maria Pisoni, Viviana Ferrazzi, Daniele Gallazzi
Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi, Milano

In Italia le infezioni da *Salmonella* spp. nel coniglio sono state segnalate negli anni passati e riguardavano prevalentemente allevamenti rurali, mentre *Yersinia pseudotuberculosis* è da sempre segnalata soprattutto nei conigli selvatici.

Le nostre indagini riguardano la presenza di queste specie batteriche in conigli allevati, sia con enterocolite cronica che regolarmente macellati. Negli ultimi otto anni sono stati sottoposti a necropsopia 1.650 conigli con enteropatia cronica provenienti da un centinaio di allevamenti commerciali italiani e recentemente sono stati controllati 10 gruppi, ciascuno costituito di 100 soggetti, di conigli regolarmente macellati, provenienti da 4 allevamenti commerciali. Ogni soggetto è stato sottoposto a necropsopia e agli esami di *routine* collaterali (parassitologico, batteriologico, istologico ecc.). Nello specifico la ricerca di *Salmonella* spp. è stata eseguita con semina in Buffered Peptone Water (37 °C per 24 h), passaggio in Rappaport Vassiliadis Soya Broth (41 °C per 24 h) e Selenite F-Broth (37 °C per 24 h) e semina successiva in XLD Agar e Hektoenn Agar (37 °C per 24 h). La conferma di specie è stata eseguita con API20E (BioMerieux) e con sierotipizzazione. La ricerca di *Yersinia* spp. è stata eseguita con semina in Yersinia PSB Broth (21 giorni a 4 °C) e successivo passaggio in Cefsulodin Irgasan Novobiocin Agar incubato a 30 °C per 24 h. La conferma di specie è avvenuta mediante API20E (BioMerieux).

Dei 1.650 conigli sottoposti a necropsopia, un centinaio presentavano focolai necrotici a livello di cistifellea e tessuti linfoidi dell'intestino distale (*sacculus rotundus* e *appendix*, 33 sono risultati positivi a *Salmonella Typhimurium*. I pochi positivi a *Y. pseudotuberculosis* (0,03% del totale) presentavano le medesime lesioni tranne che nella cistifellea. Le stesse lesioni, con prevalenza variabile dal 6% al 22,3% a seconda dei gruppi, erano presenti anche in 171 conigli controllati al macello; questi soggetti, tutti in buono stato di nutrizione, sono comunque risultati batteriologicamente negativi.

La scarsa prevalenza di questi enteropatogeni è legata alla tipologia di allevamento del coniglio che mal si presta alle infezioni a ciclo oro-fecale perché mantenuto in gabbie di rete con fondo pervio alle deiezioni. Anche il mangime è da sempre privo di rischio per il coniglio perché senza farine animali e trattato termicamente per permetterne la pellettatura. I conigli regolarmente macellati che presentavano lesioni sospette ma ormai sterili erano stati sottoposti a costante metafilassi con antibiotici attivi contro gli enterobatteri fino al periodo post-svezzamento. Tale pratica, diffusissima nell'allevamento cunicolo per prevenire le comuni batteriosi enteriche da *E. coli* e clostridi, limitano o annullano del tutto anche le occasionali infezioni da *Salmonella* o *Yersinia*.

VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA SALMONELLA IN SUINI IN ALLEVAMENTO E ALLA MACELLAZIONE

Chiara Magistrali, Pina Decurtis, Lucilla Cucco, Marta Paniccià, Luciana Gironacci, Giuliana Blasi, Giovanni Pezzotti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Si riportano i risultati preliminari di un'indagine campionaria condotta in Umbria e Marche per la valutazione della prevalenza di infezione da *Salmonella* in suini allevati e regolarmente macellati. La presenza di infezione è stata determinata tramite ricerca del patogeno da campioni di feci, in allevamento, e da feci e linfonodi ileo-cecali negli animali macellati. Contemporaneamente, sono stati rispettivamente prelevati campioni di siero di sangue e frammenti di muscolo diaframmatico, da cui ottenere siero di carne (*meat-juice*), per evidenziare la presenza di anticorpi nei confronti di *Salmonella*. Per questa indagine è stato utilizzato il kit ELISA commerciale IDEXX HerdCheck *Salmonella swine*. In 12 allevamenti sono stati prelevati 20 campioni di siero di sangue e pool di campioni di feci da altrettanti box (o dal numero di box presenti). Al macello, i prelievi di feci, organi e diaframma sono state effettuati da 15 soggetti appartenenti a 16 gruppi omogenei di animali, di origine locale o comunque nazionale. I risultati batteriologici dimostrano una elevata prevalenza di infezione, tanto in allevamento (50%) quanto al macello (81,2% di positività nelle feci e 75% nei linfonodi). Molto variabile risulta la prevalenza di infezione all'interno dei gruppi (6,7-80% per le feci; 6,7-73,3% per i linfonodi). Mediamente più elevata risulta la prevalenza di infezione osservata mediante ELISA; la positività è stata osservata nel 92% degli allevamenti e nel 93,4% dei gruppi macellati. Ne consegue un certo grado di discordanza tra i risultati ottenuti con i diversi test effettuati. *Salmonella Derby*, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Rissen*, sono risultati i sierotipi più frequentemente isolati, dei quali è stata anche valutata la sensibilità alle principali classi di antibiotici.

Terza sessione
Infezioni batteriche e antibiotico-resistenza

P24. MONITORAGGIO DELLA CONTAMINAZIONE DA VIBRIONI POTENZIALMENTE PATOGENI IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI

Nicoletta Addante (a), Cosimo O. Montagna (a), Natalia Paglionico (a), Antonio Parisi (a), Gaetano V. Celano (b), Donatella D'Aloja (c)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano (BA);

(b) Dip. Sanità e Benessere animale, Università degli Studi di Bari

(c) Libero professionista

I Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL) sono alimenti frequentemente implicati in episodi di tossinfezione alimentare; essendo in grado di concentrare sostanze tossiche e microrganismi presenti nell'ambiente in cui vivono: si stima che un pasto a base di molluschi bivalvi crudi ogni 2000 dia origine a forme morbose. I microrganismi del genere *Vibrio* sono comuni abitanti degli ecosistemi idrici, per cui risultano spesso associati ai prodotti ittici. Alcuni vibrioni sono patogeni per l'uomo, causando malattie molto gravi come il colera (*V. cholerae*) o forme setticemiche (*V. vulnificus*). Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso i cosiddetti vibrioni alofili, come *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. damsela* e *V. alginolyticus*, in quanto ritenuti responsabili di patologie nell'uomo. Particolare attenzione è rivolta a *V. parahaemolyticus*, implicato in episodi infettivi dovuti all'ingestione di prodotti della pesca: in Giappone è ritenuto l'agente causale di un quarto delle patologie gastrointestinali da consumo di alimenti.

In Italia la produzione, depurazione e commercializzazione dei MEL, sono regolate dal DL.vo 530/1992, che prevede che i MEL commercializzati per il consumo umano siano prodotti in acque con particolari requisiti microbiologici, definite di "tipo A" oppure che siano sottoposti ad un processo di depurazione. I requisiti microbiologici, che consentono di giudicare i MEL idonei al consumo umano, prevedono la presenza di meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* in 100 g di polpa e liquido intervalvare e l'assenza di *Salmonella* spp. in 25 g. Tuttavia è stato più volte rilevato che non esiste una stretta correlazione tra la presenza di microrganismi di origine fecale e microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo. In questa nota sono riportati i risultati di due anni d'indagine sulla presenza di vibrioni in campioni di MEL commercializzati in Puglia. Sono stati analizzati 644 campioni di MEL prelevati al dettaglio. Il 95,80%, 94,72% e 100% dei campioni era conforme, rispettivamente, per *E. coli*, coliformi fecali e *Salmonella* spp. Il 43,16% dei campioni risultava contaminato da vibrioni: *V. alginolyticus* (29,65%), *V. parahaemolyticus* (8,07%), *V. vulnificus* (3,26%), *V. damsela* (1,86%) e *V. cholerae* non-O1 (0,31%). I risultati ottenuti confermano l'assenza di correlazione tra germi di contaminazione fecale e vibrioni, e che questi parametri, la produzione di MEL in zone di tipo "A" o la loro depurazione non sono sufficienti ad escludere il rischio microbiologico legato alla presenza di vibrioni.

Finanziamento ricerca corrente, Ministero della Salute

P25. IL TRASPORTATORE AD ALTA AFFINITÀ DELLO ZINCO ZnuABC È ESSENZIALE PER LA VIRULENZA DI *S. TYPHIMURIUM*

Serena Ammendola (a), Paolo Pasquali (b), Giovanni Berducci (a), Giuseppe Rotilio (a),
Andrea Battistoni (a)

(a) Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata;

(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Lo zinco è un cofattore essenziale di un gran numero di proteine dove svolge funzioni catalitiche e/o strutturali. Conseguentemente, tutti gli organismi hanno sviluppato meccanismi per ottenere adeguati quantitativi di zinco ed evitare l'accumulo, potenzialmente tossico, di tale elemento all'interno delle cellule. La capacità di molti batteri di sopravvivere e moltiplicarsi in ambienti poveri di zinco è criticamente dipendente dall'attivazione del sistema di importo ad alta affinità per la zinco ZnuABC. Questo sistema, omologo ad altri membri della famiglia dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette), è costituito da tre proteine: ZnuB, una proteina integrale di membrana, ZnuC, la componente ATPasica del trasportatore, e ZnuA, una proteina solubile periplasmatica che cattura lo zinco in questo comparto cellulare e lo cede successivamente al componente transmembrana del trasportatore. Studi recenti hanno dimostrato che l'inattivazione di ZnuA o degli altri membri del trasportatore influenza in modo drammatico la capacità di batteri (*H. influenzae*, *H. ducreyi*, *B. abortus*, *P. multocida*, *N. gonorrhoeae*) di crescere in terreni privi di zinco e di sopravvivere e moltiplicarsi all'interno dell'ospite.

Per valutare l'importanza del sistema ZnuABC nella virulenza di *Salmonella*, abbiamo costruito un mutante ZnuA negativo nel ceppo di *S. Typhimurium* ATCC 14028. Tale mutazione non altera la capacità di *Salmonella* di crescere in terreni ricchi (LB) o di sopravvivere in macrofagi in coltura, ma diminuisce drasticamente la crescita batterica in terreni deprivati di zinco. Tramite infezioni intraperitoneali e orali su topi BALB/c e DBA/2 abbiamo osservato che la dose letale del mutante *znuA* negativo è circa 1000 volte superiore a quella del ceppo selvatico. L'espressione di *znuA* è stata studiata in vitro e nel corso dell'infezione mediante l'introduzione di un opportuno epitopo a livello cromosomale. Il gene è espresso ad alti livelli in batteri cresciuti in terreni privi di zinco, mentre appare essere represso sia nei batteri cresciuti in LB che nelle *Salmonelle* recuperate da macrofagi in coltura o dalle milze di topi infettati.

I nostri dati suggeriscono che il trasportatore ZnuABC svolge un ruolo essenziale nelle infezioni da *Salmonella*, in quanto favorisce il reperimento di adeguati quantitativi di zinco in specifici ambienti dell'ospite in cui la disponibilità di tale elemento è particolarmente scarsa.

P26. ANALISI DEL RUOLO DI *sodC1* E *sodC2* IN DIVERSI SIEROTIPI DI *SALMONELLA ENTERICA*

Serena Ammendola (a), Paolo Pasquali (b), Piera Valenti (c), Francesca Pacello (a), Nara Figueroa-Bossi (d), Lionello Bossi (d), Giuseppe Rotilio (a), Andrea Battistoni (a)
(a) Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata; (b) Istituto Superiore di Sanità, Roma; (c) Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università di Napoli; (d) Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

Numerosi ceppi di *Salmonella enterica* possiedono due geni codificanti per l'enzima Cu,Zn superossido dismutasi, *sodC1* e *sodC2*, localizzati, rispettivamente, su un profago lambdaoide e sul cromosoma. Questi geni possono contribuire alla patogenicità di *Salmonella* proteggendo i batteri dalle specie reattive dell'ossigeno generate dai fagociti dell'ospite. Sebbene numerosi studi condotti nel nostro e in altri laboratori abbiano dimostrato l'importanza dei geni *sodC* per la sopravvivenza intracellulare e per la patogenicità batterica, è ancora controverso il contributo relativo dei due geni alla virulenza di *Salmonella* spp. Al fine di meglio comprendere il ruolo di *sodC1* e *sodC2* è stata analizzata la loro espressione e il loro contributo nei confronti della capacità di *Salmonella* di proliferare in topi infettati per via intraperitoneale da differenti ceppi appartenenti ai sierotipi *Typhimurium*, *Enteritidis* e *Choleraesuis*. Questi studi hanno dimostrato che in *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* l'assenza di *sodC1* diminuisce in modo molto rilevante la capacità di *Salmonella* di indurre un'infezione sistemica, mentre la delezione di *sodC2* non provoca alcun effetto. Questi dati sono ben correlati al fatto che *sodC1* è l'unica delle due proteine ad essere sintetizzata ad alta concentrazione nei batteri che proliferano nei macrofagi o nella milza degli animali infettati. In contrasto, in *S. Choleraesuis*, l'inattivazione di *sodC2* porta ad una maggiore diminuzione della capacità di indurre salmonellosi murina rispetto a quella osservata in seguito alla eliminazione di *sodC1*. Inoltre in *S. Choleraesuis*, *sodC2* contribuisce in misura più rilevante di *sodC1* alla sopravvivenza in macrofagi attivati e in cellule epiteliali.

I nostri risultati confermano l'importanza dei geni *sodC* nelle infezioni da *Salmonella* spp. e suggeriscono che il contributo relativo dei geni *sodC1* e *sodC2* nell'interazione ospite-patogeno possa variare nei diversi sierotipi e/o in diversi ceppi di *Salmonella*.

P27. METODO DI IDENTIFICAZIONE E CLASSIFICAZIONE DI PLASMIDI MEDIANTE PCR

Alessia Bertini (a), Laura Villa (a), Vincenzo Falbo (a), Katie Hopki (b),
John E. Threlfall (b), Alessandra Carattoli (a)

(a) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Health Protection Agency, Colindale, London*

L'incompatibilità è l'incapacità di due plasmidi, presenti all'interno della stessa cellula, di essere stabilmente ereditati in assenza di una selezione esterna e dipende dalle sequenze dell'origine di replicazione e del controllo del numero di copie. L'identificazione dei gruppi d'incompatibilità è uno strumento utile per il riconoscimento specifico di plasmidi. I plasmidi sono riconosciuti come il principale meccanismo di disseminazione orizzontale di geni di resistenza agli antibiotici nei batteri gram-negativi. La possibilità di seguire i plasmidi di resistenza mediante il riconoscimento specifico delle origini di replicazione rappresenta quindi uno strumento molto sensibile per tracciare la fonte e la diffusione di plasmidi rilevanti da un punto di vista epidemiologico e clinico.

I metodi finora utilizzati per l'identificazione dei plasmidi (coniugazione, trasformazione, *replicon typing* mediante ibridazione) sono complessi e difficili da riprodurre su un gran numero di isolati. Abbiamo sviluppato un nuovo metodo di caratterizzazione dei plasmidi batterici basato sull'amplificazione specifica dei repliconi per PCR. Il metodo è stato progettato per ottenere il riconoscimento specifico di almeno 18 repliconi corrispondenti a quindici gruppi d'incompatibilità.

Al fine di esaminarne la specificità, il metodo di tipizzazione per PCR è stato testato su una collezione di plasmidi di riferimento appartenenti a gruppi d'incompatibilità noti. Il metodo è risultato altamente specifico, semplice e di facile esecuzione (il che permette di caratterizzare un gran numero di plasmidi in poco tempo).

Il metodo è stato quindi applicato a collezioni di *Salmonella* ed *Escherichia coli* di origine umana che mostrano resistenza al ceftriaxone, evidenziando plasmidi ricorrenti e diffusi responsabili della disseminazioni di questo tipo di resistenze di rilevanza clinica per l'uomo.

P28. STUDIO SULLA PRESENZA E DIFFUSIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEGLI AMBIENTI DI PRODUZIONE E STAGIONATURA DEL GORGONZOLA D.O.P.

Paolo Daminelli (a), Marina Nadia Losio (a), Guido Finazzi (a), Paola Monastero (a),
Sonia Gobbin (a), Matteo Spisani (b), Roberto Faita (b), Cristina Panteghini (a),
Michela Tilola (a), Nadia Zanardini (a), Paolo Boni (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed E. Romagna, Dipartimento
Alimenti e S.A., Brescia; (b) Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Milano

La sicurezza alimentare è un obiettivo primario della politica internazionale. La garanzia di un elevato grado di sicurezza alimentare dipende da una corretta gestione dei rischi legati ai processi produttivi, basata su un effettivo e documentato impegno di controllo con dimostrazione di trasparenza ed efficacia. Questo è l'unico mezzo per recuperare la situazione di crescente sfiducia dei consumatori che, vittime delle ripetute emergenze, delle continue campagne scandalistiche e dell'incapacità di comunicazione del sistema produttivo e di controllo, non percepiscono le pur esistenti condizioni di sicurezza. Obiettivo del lavoro, nato dalla collaborazione tra Consorzio del Gorgonzola D.O.P., Regione Lombardia e Piemonte, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna e Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e V. d'Aosta è stato valutare la prevalenza di *L. monocytogenes* negli ambienti di produzione del Gorgonzola D.O.P. mediante analisi eseguite su campioni raccolti presso caseifici e stagionatori, anche al fine di definire le possibili fonti di contaminazione. I metodi di prova utilizzati (analisi microbiologica mediante sistema Vidas-Biomérieux Metodo Validato AFNOR Bio-12/2-06/94 e Bio-12/11-03/04, conferma tramite PCR e Real-TimePCR-AB7300, seguita da ribotipizzazione dei ceppi isolati mediante Riboprinter-DuPoint) sono stati applicati su tamponi provenienti da superfici di lavorazione, sui raschiati delle croste di formaggio entro 10 giorni dal termine della stagionatura e hanno permesso di fotografare la prevalenza di questo patogeno in un prodotto dichiarato, da disciplinare, "a crosta non edibile". Gli esiti riportano una prevalenza di *L. monocytogenes* nell'ambiente pari a circa il 10% dei campionamenti, mentre nelle croste il valore tende a raddoppiare; le analisi in PCR confermano la positività riscontrata con il metodo microbiologico ma dimostrano una sensibilità decisamente superiore nei casi in cui, per la bassa concentrazione del patogeno o per la presenza di ceppi disvitali, l'analisi tradizionale non rileva positività per *L. monocytogenes*. I risultati della real time PCR condotti sulle croste consentono inoltre di quantificare la presenza del patogeno, presente in un range di concentrazioni compreso tra $2,92 \times 10^2$ e $9,04 \times 10^5$ ufc/g. I dati ottenuti dalla ribotipizzazione dei ceppi permettono di tracciare le fonti di contaminazione. I dati delineano che le condizioni di produzione del Gorgonzola D.O.P richiedono un'accurato rispetto delle procedure di sanificazione negli ambienti di lavorazione per impedire che *L. monocytogenes*, presente come germe ubiquitario negli ambienti di lavorazione (in particolare sifoni di scarico, pavimento), possa contaminare il prodotto in stagionatura e rappresentare un pericolo in sede di porzionatura e commercializzazione del prodotto.

P29. PREVALENZA E RIBOTIPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CAMPIONI DI GORGONZOLA PRELEVATI IN LOMBARDIA

Alessandra De Cesare (a), Gerardo Manfreda (a), Simone Stella (b), Carlo Cantoni (b)
(a) Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna
(b) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare,
Università di Milano

In questo studio è stata valutata l'incidenza di *Listeria monocytogenes* in 1.656 campioni di formaggio gorgonzola raccolti in una stessa azienda dopo il confezionamento e al termine della vita commerciale del prodotto. Dai campioni positivi e dall'ambiente sono stati isolati e purificati 30 ceppi, caratterizzati geneticamente mediante ribotipizzazione automatica con *EcoRI*. L'identificazione del codice DUPONT (DUP-ID) dei ceppi caratterizzati e il confronto tra il loro profilo di ribotipizzazione e quello degli isolati presenti nella banca dati PathogenTracker ha permesso di ipotizzarne il potenziale di patogenicità. Inoltre l'analisi cluster dei profili di ribotipizzazione ha consentito di valutare il livello di similarità genetica degli isolati.

L'incidenza di *Listeria monocytogenes* nei campioni di gorgonzola collezionati dopo il confezionamento e al termine della vita commerciale del prodotto è risultata, rispettivamente, pari al 2,1 e 4,8%. Queste percentuali sono inferiori rispetto a quelle pubblicate per altri formaggi erborinati, ma evidenziano che durante la conservazione *Listeria monocytogenes* si moltiplica nel prodotto.

La popolazione di ceppi ribotipizzati ha mostrato un basso livello di diversità genetica. Infatti il 70% degli isolati sono stati classificati nello stesso ribotipo. Dal punto di vista della potenziale patogenicità, il 90% dei ceppi sono stati assegnati a DUP-IDs appartenenti alla II linea di patogenicità nota per *Listeria monocytogenes*, che include isolati di sierotipo 1/2a, 1/2c e 3c. Il confronto tra i profili di ribotipizzazione dei ceppi da gorgonzola e quelli del PathogenTracker ha evidenziato che il 15,4% degli isolati da prodotto confezionato, il 19,7% degli isolati da prodotto al termine della vita commerciale e l'8,1% degli isolati ambientali presentava elevata similarità (99%) con isolati sporadici umani.

P30. PCR E RILEVAZIONE AUTOMATIZZATA PER L'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI PATOGENI IN PRODOTTI ORTOFRUTTICOLI DI IV GAMMA

Maria De Giusti, Daniela Tuffi, Federica Trinti, Antonio Boccia
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università di Roma "La Sapienza"

I prodotti vegetali minimamente trattati ("IV gamma") hanno trovato negli ultimi anni una notevole diffusione, favorita da nuove abitudini di vita e di lavoro, inserendosi, così, con successo nel mercato ortofrutticolo. Ciò ha portato gli operatori di sanità pubblica a porre una maggiore attenzione verso la qualità del prodotto e dei sistemi produttivi in ragione dei pericoli intrinseci e della facilità di deterioramento microbico proprio di queste matrici notoriamente veicoli di patogeni enterici. È in tale contesto che si inserisce il nostro studio che riconosce come obiettivo specifico quello di verificare la qualità microbiologica dei prodotti di IV gamma e valutare il pericolo attribuibile a patogeni enterici quali: *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Lo studio è stato condotto su un totale di 60 prodotti vegetali di IV gamma di marche diverse (30 insalate, 20 sedani e 10 peperoni) prelevati dalla grande distribuzione romana. Per la ricerca dei patogeni ci si è avvalsi della tecnica PCR mediante l'impiego di un nuovo sistema automatizzato (BaxSystem-DuPont Qualicon) validato AFNOR/AOAC, con rilevazione automatica in fluorescenza degli amplificati. I campioni sono stati analizzati, contemporaneamente, anche con metodologie colturali normate ISO (*Salmonella* spp. UNI ISO 6579/2002; *E. coli* O157 UNI ISO 16654/2001) e disposti dall'Ordinanza Ministeriale 17/12/1993 per *L. monocytogenes*.

Dei 60 campioni analizzati nessuno è risultato positivo per presenza dei patogeni ricercati con entrambe le metodologie. In 5 campioni (8,3%) è stata riscontrata presenza di *Escherichia coli* in concentrazioni superiori al limite massimo di 100 UFC/g riportato dalla legislazione francese.

Il sistema automatizzato Bax, si propone come una valida alternativa alle metodiche colturali convenzionali nello screening degli alimenti, trovando applicazione anche in ambito HACCP. È in grado di fornire in tempi rapidi (4-5 ore/esclusa la fase di prearricchimento, contro 3-5 giorni dei metodi colturali), risultati affidabili anche per campioni con bassi livelli di contaminazione. Inoltre, la standardizzazione dei protocolli Bax e la facilità di esecuzione, consentono di minimizzare i costi relativi al personale (numero/qualifica) e il coinvolgimento anche di personale formato/non specializzato.

P31. PCR DUPLEX REAL TIME PER LA DETERMINAZIONE DI SALMONELLA SPP. E SALMONELLA ENTERITIDIS

Elisabetta Delibato, Luciana Croci, Dario De Medici, Simona Di Pasquale, Emma Filetici,
Sergio Arena, Laura Toti
Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'incidenza delle salmonellosi rappresenta, ancora oggi, un rilevante problema di sanità pubblica per la maggior parte dei paesi industrializzati. Tra i diversi sierotipi un ruolo primario è sicuramente rivestito da *S. Enteritidis* che insieme a *S. Typhimurium* risulta essere, da diversi anni, l'agente causale più frequente di tossinfezione nell'uomo. Il metodo colturale classico per la determinazione della Salmonella negli alimenti necessita di tempi piuttosto lunghi, ed è quindi sempre più sentita l'esigenza di avere a disposizione dei metodi rapidi e sensibili, allo scopo di realizzare programmi di monitoraggio più tempestivi ed efficaci. Per soddisfare queste esigenze, in questi ultimi anni è stato sviluppato un grande numero di metodi screening basati sull'utilizzo della PCR.

L'obiettivo di questo studio è lo sviluppo di un metodo rapido sensibile e di facile esecuzione, per la determinazione contemporanea sia di *Salmonella* spp. che, in particolare, di *Salmonella Enteritidis*, mediante una tecnica di PCR "duplex" real time basata sul SYBR Green.

A tale scopo è stata utilizzata una coppia di primers SDF per l'amplificazione della *S. Enteritidis* combinata con una coppia di primers Stynva-JHO per l'amplificazione della *Salmonella* spp. La specificità della reazione è stata valutata determinando la temperatura di melting di ogni amplicone.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 17 differenti fagotipi di *S. Enteritidis*, 35 diversi sierotipi di *Salmonella* e 10 ceppi batterici non-salmonella.

I risultati hanno confermato la specificità delle due coppie di primers utilizzate; la concentrazione che ha fornito i migliori risultati in termini di sensibilità (102 cells/mL) è risultata essere quella di 200 nM per entrambe le coppie di primers utilizzate. La temperatura di melting ottenuta utilizzando i primers Stynva-JHO e i primers SDF è rispettivamente di 77.32 ± 0.12 °C e 83.29 ± 0.13 °C.

Il metodo PCR duplex real time SYBR Green risulta essere rapido, sensibile, specifico, utile quindi nella prima fase degli studi mirati alla determinazione della Salmonella negli alimenti.

P32. CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS E SUE TOSSINE ISOLATE DA ALIMENTI DESTINATI ALL'UOMO

Elisabetta Di Giannatale, Vincenza Prencipe, Alfreda Tonelli, Anna Franca Sperandii,
Antonietta Topi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

438 campioni di alimenti (carni fresche, insaccati freschi, latte e derivati, prodotti di pasticceria e preparazioni gastronomiche) sono stati analizzati per la ricerca e numerazione di *Staphylococcus aureus* e i ceppi isolati sono stati testati per la produzione di enterotossina. Il 19,18% dei campioni sono risultati positivi di cui il 33,62% erano prodotti a base di latte, 19,32% carni avicole e 3,64% prodotti di pasticceria e paste alimentari. Degli 84 ceppi isolati dagli alimenti il 3,84% sono risultati enterotossigeni.

Gli isolati batterici sono stati successivamente sottoposti a conferma dell'identificazione mediante il test del 16SDNA e a caratterizzazione genica per la presenza di di geni codificanti le enterotossine (SE) SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e la Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1). Al test SET RPLA (Oxoid) il 17,86% dei prodotti esaminati risulta contaminato da ceppi produttori di enterotossine A, B, C e D. Il 36,7% degli ceppi saggiati in PCR è risultato portatore di uno o più geni per la produzione di SE e quindi potenzialmente enterotossigeni.

P33. SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI SALMONELLA SPP. ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE IN CAMPANIA NEL TRIENNIO 2000/2003

Ludovico Dipineto, Lucia Francesca Menna, Claudia Scarpetta, Mariarosaria Calabria, Mariangela Sensale, Alessandra Cuomo, Alessandro Fioretti
Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli Federico II

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza batterica è una emergenza sanitaria per le sue ripercussioni sia nel settore veterinario che sulla salute pubblica. L'utilizzo indiscriminato di antibiotici ha avuto, come diretta conseguenza, la comparsa di germi caratterizzati da antibiotico-resistenza multipla. In campo avicolo, rivestono notevole importanza le infezioni sostenute da *Salmonella* spp., sia essa specie-specifica (*S. gallinarum*, *S. pullorum*), che responsabili di tossinfezioni alimentari (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*).

Durante il triennio 2000/2003, presso il Centro Sperimentale Avicunicolo, sede distaccata del Dipartimento di Patologia e Sanità Animale dell'Università di Napoli Federico II, sono stati isolati, con incidenza sempre maggiore, ceppi di *Salmonella* spp. risultati resistenti ai più comuni antibiotici utilizzati in campo avicolo. Alla luce di tali risultati è stata valutata la sensibilità agli antibiotici su 60 ceppi di *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*), rispettivamente 20 per ciascun sierotipo, isolati da galline ovaiole.

La sensibilità agli antibiotici è stata saggiata mediante il metodo per diffusione dei dischi su piastra per i seguenti antibiotici: Ciprofloxacina (5µg), Enrofloxacin (5µg), Flumequina (30µg), Acido Nalidixico (30µg), Apramicina (15µg), Amoxicillina (10µg), Neomicina (30µg), Gentamicina (10µg), Ossitetraciclina (30µg), Sulphametoxazolo/Trimetoprim (25µg). I risultati ottenuti mostravano, complessivamente, una più alta percentuale di resistenza agli antibiotici di *S. gallinarum* rispetto agli altri due sierotipi presi in esame. In particolare, *S. gallinarum* manifestava resistenza nei confronti di ciprofloxacina ed enrofloxacin (rispettivamente 15% e 23%), mentre *S. enteritidis* e *S. typhimurium* presentavano completa sensibilità. Tutti i sierotipi valutati presentavano alte percentuali di resistenza nei confronti di neomicina, gentamicina e ossitetraciclina. Nei confronti dei sulfamidici i ceppi testati presentavano resistenza nulla.

Il dato più interessante da rimarcare è quello relativo alla resistenza dimostrata dai ceppi di *S. gallinarum* testati nei confronti dei fluorochinoloni di ultima generazione. In particolare, l'uso della ciprofloxacina è stato effettuato esclusivamente per testare il comportamento di questi ceppi nei confronti di un antibiotico impiegato in umana. La resistenza dimostrata da *S. gallinarum* nei confronti di questo antibiotico è un dato importante essendosi verificata verso una molecola simile ma non direttamente impiegata in terapia veterinaria. Tale risultato permette di sollecitare ancora una volta la pericolosità di un approccio terapeutico inadeguato alle malattie batteriche e il relativo impatto che questo può provocare non solo in campo veterinario ma anche sulla salute pubblica.

Tali risultati suggeriscono, pertanto, un uso più moderato e mirato degli antibiotici negli allevamenti in modo da ridurre la selezione e diffusione di ceppi multiresistenti.

P34. RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *E. COLI*, *ENT. FAECIUM* ED *ENT. FAECALIS* ISOLATI DA VARIE SPECIE ANIMALI IN ITALIA

Alessia Franco (a), Luca Busani (b), Caterina Graziani (b), Antonia Ricci (c), Denis Vio (c), Franco Paterlini (d), Giuseppe Merialdi (d), Giancarlo Ferrari (a), Elisabetta Di Giannatale (e), Renato Giulio Zanoni (f), Valeria Sanguinetti (f), Mirko Rossi (f), Antonio Battisti (a) (a) IZS Lazio e Toscana, Roma; (b) Istituto Superiore Sanità, Roma; (c) Centro di Referenza Salmonellosi, Legnaro; (d) IZS Lombardia Emilia Romagna; (e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo Molise; (f) Università di Bologna

E. coli e gli Enterococchi sono batteri commensali dell'intestino umano e degli animali. Sono sottoposti a pressioni selettive ogniqualvolta vengano usati antibiotici, e possono quindi fungere da indicatori degli effetti dell'uso di antibiotici sulle popolazioni batteriche. Inoltre rivestono notevole importanza come potenziale serbatoio di determinanti genetici di resistenza in grado di essere trasferiti ad altri batteri patogeni e zoonosici. La loro analisi consente la comparazione tra differenti tipologie d'allevamento, tra specie animali diverse e tra diverse regimi di trattamento con antibatterici. Il Centro di Referenza per l'Antibioticoresistenza (CRAB) ha condotto, in collaborazione con vari IZS e l'Università di Bologna, un monitoraggio sulla resistenza agli antibiotici in *E. coli*, *E. faecium* ed *E. faecalis* indicatori, raccolti in bovini, ovini, suini, avicoli cani e gatti. Il campionamento è stato effettuato al macello per le specie zootecniche e presso la clinica universitaria e il CRAB per gli animali da compagnia. I saggi di sensibilità sono stati eseguiti mediante la tecnica di diffusione in agar (Kirby-Bauer), secondo le procedure della *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Nel triennio 2001-2003 sono stati collezionati ed analizzati 1519 isolati di *E. coli*, 301* isolati di *Enterococcus faecium* e 52* isolati di *Enterococcus faecalis* da specie zootecniche; 147 *E. coli*, 34* isolati di *Enterococcus faecalis* e 21* isolati di *Enterococcus faecium* da animali da compagnia. Sia per *E. coli* che per *Enterococcus faecium/faecalis* la proporzione degli isolati resistenti alle differenti molecole saggate varia in rapporto alla specie oggetto di studio e riflette i diversi regimi d'uso dei farmaci antimicrobici nelle produzioni zootecniche e negli animali da compagnia. Significative infatti risultano le differenze nelle resistenze osservate per molte delle molecole saggate. Per gli isolati di *E. coli* in particolare, i livelli di resistenza più elevati si evidenziano per le molecole impiegate da lungo tempo in medicina veterinaria (tetraciclina, sulfamidici, streptomina ed ampicillina) e per quelle di utilizzo "storico" ma attualmente bandite in zootecnia (cloramfenicolo). Per *Enterococcus faecium/faecalis* i livelli di resistenza più alti sono nei confronti di penicillina, eritromicina e tetraciclina, ma notevole importanza riveste la resistenza nei confronti della vancomicina (23% nel pollo e 16% nel bovino adulto), soprattutto a fronte del bando dell'impiego in zootecnia del suo analogo, l'avoparcina. L'obiettivo che ci si propone per il futuro è quello di estendere a tutto il territorio nazionale il Sistema di Monitoraggio in batteri indicatori da specie zootecniche così come la nuova Direttiva Comunitaria in materia di zoonosi prevede per gli Stati Membri, sviluppando il monitoraggio negli animali da compagnia.

P35. CARATTERIZZAZIONE DI STIPITI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA POLLI E TACCHINI ALLEVATI IN ITALIA E IN CROAZIA

Alessandra Gentili (a,d), Fabiana Demarco (a,d), Borka Simpraga (b), Michela Corrò (c),
Antonia Ricci (c), Stefano Morabito (a), Agostino Macrì (a), Alfredo Caprioli (a)
(a) *Istituto Superiore di Sanità, Roma*; (b) *Poultry Centre, Bacteriology Departement,
Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia*; (c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Venezie, Legnaro*; (d) *International Chemical Industry SpA., Cellule (Caserta)*

Le infezioni da *Escherichia coli* rappresentano una frequente causa di patologie intestinali ed extraintestinali sia negli uomini che negli animali. Le colibacillosi aviarie sono causate da stipiti di *E. coli* noti come APEC (Avian pathogenic *E. coli*) e si manifestano principalmente come sacculiti, pericarditi e periepatiti, provocando gravi perdite economiche nell'allevamento avicolo intensivo e semi-intensivo. Tra gli stipiti di *E. coli* che infettano l'uomo rivestono particolare importanza i ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC). L'infezione umana da VTEC, è una zoonosi, trasmessa principalmente attraverso il consumo di alimenti di origine bovina, ma sono noti anche altri veicoli di disseminazione. Generalmente le specie aviarie non sono considerate serbatoi di *E. coli* agenti di zoonosi, tuttavia in uno studio condotto in Slovacchia, è stata dimostrata la presenza di VTEC O157 in 20 su 216 polli e tacchini di allevamento (9,2%). Inoltre ceppi VTEC sono stati descritti in campioni di feci provenienti da piccioni catturati nell'area urbana di Roma. Questi VTEC producevano una verocitotossina adattata all'ospite aviario (VT2f), ma possedevano altri determinanti di virulenza associati agli stipiti VTEC patogeni per l'uomo quali l'intimina (gene *eae*).

In questo studio, ceppi di *E. coli* isolati da campioni autoptici provenienti da tacchini allevati in Croazia (43) e da polli allevati in Italia (13), sono stati sottoposti ad amplificazione enzimatica in vitro (PCR) per evidenziare la presenza dei geni di virulenza generalmente associati a stipiti di APEC quali *traT*, *iss*, *iroN*, *cvaC*, *iucD*, *tsh*. Le colture batteriche sono state inoltre saggiate per la produzione di verocitotossine e per la presenza dei geni *eae*, *Agg*, CNF e CDT la cui presenza è associata a ceppi di *E. coli* responsabili sia di forme enteriche che di infezioni extraintestinali nell'uomo.

Tutti i campioni provenivano da animali con infezione di tipo sistemico. Dei 56 campioni 44 sono risultati positivi per *traT* (78,5%), 40 per *iss*, (71,4%) 33 per *cvaC* (58,9%), 39 per *iucD* (69,6%), e 27 per *tsh* (48,2%). Questi risultati confermano la forte associazione di questi geni con stipiti virulenti di APEC. Nessuno dei campioni analizzati è risultato positivo per i determinanti di virulenza associati a stipiti di *E. coli* agenti di zoonosi, indicando, che le specie aviarie di allevamento prese in considerazione potrebbero non essere serbatoio di questi patogeni. Un nuovo campionamento comprendente anche animali asintomatici è in corso per definire il potenziale rischio d'infezione per l'uomo associato al consumo di alimenti di origine aviaria.

P36. COMPARAZIONE DELLA PATOGENICITÀ DI CEPPI DI VIBRIO ALGINOLYTICUS ISOLATI DA MOLLUSCHI BIVALVI DELLA LAGUNA DI VENEZIA E DELLA BAIA DI GUANABARA (RJ, BRASILE)

Andrea Lafisca (a), Cristiane Soares Pereira (b), Dalia dos Prazeres Rodrigues (b),
Valerio Giaccone (a)

(a) *Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova*

(b) *Istituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasile*

V. alginolyticus è frequentemente presente sia nelle acque del Mar Mediterraneo, che nell'Oceano Atlantico. Infezioni cutanee causate da questo batterio, comuni tra persone che sono esposte all'acqua marina contaminata, sono caratterizzate da necrosi cutanea, ulcere e bolle ripiene di liquido sieroso-emorragico. In persone a rischio, quali quelle immunodepresse, affette da diabete mellito o da patologie epatiche in genere, l'infezione può causare setticemia, a volte letale. La patogenicità è correlata, oltre che ad altri fattori, al possesso di esoenzimi proteolitici, che consentono al batterio di invadere il tessuto sottomucoso e sottocutaneo e di penetrare nei vasi sanguigni. In questo studio si analizza il possesso e la prevalenza di elastasi, collagenasi e condroitinasi in ceppi di *V. alginolyticus* isolati da bivalvi provenienti dalla laguna di Venezia (*Mytilus galloprovincialis* e *Ruditapes semidecussatus*) e dalla baia di Guanabara (RJ, Brasile) (*Perna perna*). Il modello più frequente è quello che prevede il possesso di tutti e tre gli enzimi (52,94%), sia nei ceppi italiani che in quelli brasiliani. Tra i ceppi italiani non è presente nessuno che possieda due enzimi. Tra i ceppi brasiliani, questi sono più frequenti di quelli che ne esprimono uno solo. Un solo ceppo (brasiliiano) non esprime nessun enzima. Questi batteri rivestono importanza sanitaria, in quanto le lesioni da essi provocate a livello cutaneo albergano spesso altri batteri potenzialmente enteropatogeni (sia Gram positivi, che Gram negativi), che trovano nella lesione dei *Vibrio* un ambiente ideale per il loro sviluppo. Questo è di particolare importanza quando ad essere colpiti sono pescatori e pescivendoli, che facilmente trasferiscono tutti questi batteri da un prodotto della pesca all'altro, aumentando così la possibilità di contaminazione da parte degli acquirenti finali. Le setticemie da *Vibrio*, così come le dermatiti, hanno sintomi abbastanza aspecifici, che ne rendono difficile il riconoscimento e l'attuazione di un'adeguata terapia antibiotica. *Vibrio alginolyticus* è sensibile agli antibiotici attualmente utilizzati, ma un improprio uso di questi, soprattutto nella cura delle lesioni dermiche più lievi, può portare alla selezione di ceppi batterici resistenti.

P37. ESCHERICHIA COLI O157 VEROCITOTOSSINA- PRODUTTORI (VTEC) IN BAMBINI AFFETTI DA GASTROENTERITE ACUTA IN PUGLIA

Angela M.V. Larocca (a), Maria Chironna (a), Arcangela Viniero (a), Cesare Di Bari (b),
Michele Quarto (a)

(a) DIMIMP-Sezione di Igiene, Università di Bari

(b) Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, ASL/BA4, Bari

L'obiettivo è quello di valutare la prevalenza di ceppi VTEC in bambini ospedalizzati per gastroenterite acuta secondo il protocollo standard dettato dalla normativa ISO 16654:2001.

Tra maggio 2002 e giugno 2003 sono stati collezionati campioni di feci da bambini affetti da gastroenterite acuta ricoverati presso l'Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII di Bari. Per ogni bambino sono stati rilevati dalla cartella clinica i dati anagrafici e gli eventuali fattori di rischio.

Sono stati collezionati in totale 478 campioni di feci. Di questi sono stati analizzati preliminarmente i campioni di 174 bambini (96 maschi e 78 femmine), con età media 5,05 anni (range 2-15 anni). Dei 174 campioni di feci analizzati, sono stati isolati 14 ceppi di *Escherichia coli* O157, con un dato di prevalenza pari all'8%.

Dei 14 ceppi che alla tipizzazione sierologica hanno evidenziato la presenza dell'antigene somatico O157, 13 presentavano anche l'espressione dell'antigene ciliare H7, mentre 1 ne era privo. Per tutti i 14 i ceppi identificati sierologicamente come *Escherichia coli* O157, è stata dimostrata la capacità di produrre verocitotossine.

In Italia, contrariamente a quanto accade in altri paesi europei, si segnala un numero limitato di isolamenti di VTEC O157 da parte dei laboratori di microbiologia clinica, verosimilmente perché l'indagine non è eseguita routinariamente nei soggetti con gastroenterite. Appare necessario, anche sulla base di questi dati preliminari, rafforzare le iniziative di sorveglianza e controllo di tale infezione nella nostra regione con un approccio multidisciplinare che coinvolga competenze epidemiologiche, microbiologiche e veterinarie.

P38. RICERCA DI INTEGRONI E VALUTAZIONE DEI PROFILI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN *CAMPYLOBACTER* SPP. DI ORIGINE UMANA

Annalisa Leone (a), Giancarlo Ripabelli (a), Incoronata Fanelli (a),
Michela Lucia Sammarco (a), Ida Luzzi (b)

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

(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Campylobacter jejuni e *C. coli* sono responsabili di malattie diarroiche acute. Gli antimicrobici più usati in terapia sono eritromicina, fluorochinoloni e tetraciclina. La crescente resistenza batterica agli antimicrobici può essere causata dall'acquisizione di integroni, elementi genetici mobili, che ne veicolano i geni responsabili. In questo studio sono stati valutati i profili di resistenza a 20 antimicrobici (amoxicillina/acido clavulanico, ampicillina, aztreonam, cloramfenicolo, ciprofloxacina, claritromicina, gentamicina, colistina solfato, clindamicina, eritromicina, acido nalidixico, oxacillina, cefalotina, streptomina, sulfonamidi, sulfafurazolo, spettinomina, sulfametoxazolo/trimetoprim, tetraciclina, trimetoprim) ed è stata valutata, mediante PCR, la presenza di integroni (*int*, *qacE*, *sulI*) in 46 *C. jejuni* (29 umani, 5 animali, 12 alimentari) e 37 *C. coli* (21 umani, 8 animali, 8 alimentari). I ceppi di origine animale e alimentare hanno mostrato profili di resistenza superiori a quelli di origine umana. Sia *C. jejuni* sia *C. coli* sono risultati resistenti alla sulfonamide (umani: 79,31% e 57,14%; animali: 80% e 75%; alimentari: 83,33% e 62,5% rispettivamente), suggerendo la presenza di integroni di Classe I. Anche nell'ambito dei chinoloni la resistenza è risultata alta nei ceppi di origine animale (*C. jejuni*: ciprofloxacina e acido nalidixico 60%; *C. coli*: ciprofloxacina 62,5%, acido nalidixico 75%) e alimentare (*C. jejuni*: ciprofloxacina e acido nalidixico 75%; *C. coli*: ciprofloxacina 62,5%, acido nalidixico 75%) rispetto a quelli umani (*C. jejuni*: ciprofloxacina 41,4%, acido nalidixico 44,8%; *C. coli*: ciprofloxacina e acido nalidixico 47,6%). La resistenza all'eritromicina è maggiore nei *C. jejuni* di origine animale (20%) e alimentare (50%) rispetto agli umani (17,2%), mentre per *C. coli* i ceppi umani sono risultati più resistenti (33,3%) di quelli alimentari (25%) e meno di quelli animali (62,5%). Ugualmente la resistenza verso la tetraciclina è stata maggiore nei ceppi di animali (*C. jejuni* 40%; *C. coli* 87,5%) e alimentari (*C. jejuni* 66%; *C. coli* 75%) piuttosto che in quelli umani (*C. jejuni* 17,2%; *C. coli* 38,1%). La resistenza (R-type) manifestata è oscillata tra 3 e 20 antimicrobici. I frammenti amplificati mediante PCR hanno generato 19 profili integronici (IP) identificati con numeri romani. La grandezza degli ampliconi variava tra 100-1500 bp. Ogni IP è stato associato fino a 5 differenti R-type. Gli IP più comuni sono stati il II (350 bp) e il III (150, 600 bp), prodotti dall'amplificazione di ceppi di origine umana, eccetto un IP II generato da un *C. jejuni* di origine alimentare. *Campylobacter* spp. condivide l'habitat gastrointestinale di uomo e animali con altri microrganismi gram-negativi, con cui interagisce trasferendo geni responsabili della resistenza agli antibiotici. Inoltre, l'uso eccessivo in zootecnia di antibiotici rende più resistenti i ceppi animali e alimentari rispetto agli umani. I profili genetici prodotti dall'amplificazione delle strutture integroniche potrebbero essere un valido metodo per studiare l'epidemiologia molecolare, per comprendere la diversità genomica e l'evoluzione di *Campylobacter* spp.

P39. DISCRIMINAZIONE DI CEPPI DI *S. ENTERICA* SIEROTIPO *ABORTUSOVIS* MEDIANTE ELETTROFORESI IN CAMPO PULSATO

Chiara Magistrali (a), Anna Maria Dionisi (b), Giovanni Filippini (a), Ildo Benedetti (b), Slawomir Owczarek (b), Ida Luzzi (b), Alessandra Carattoli (b), Stefania Scuota (a), Giovanni Pezzotti (a)

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

(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Per verificare la capacità discriminante della tecnica dell'elettroforesi in campo pulsato (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) su ceppi di *S. enterica* sierotipo *Abortusovis*, sono stati analizzati 24 stipiti batterici, isolati negli anni 1998-2004, da focolai di aborto ovino e provenienti da allevamenti situati in aree diverse dell'Italia centrale. La tecnica della PFGE consente di ottenere per ciascun ceppo esaminato un profilo di bande specifico e riconoscibile ed è correntemente utilizzata per il monitoraggio e l'identificazione di ceppi clonali ed epidemici di *Salmonella* spp. in ceppi di origine animale, umana e isolati dagli alimenti. Questi profili si ottengono mediante digestione del DNA del cromosoma batterico con enzimi di restrizione e separazione dei frammenti ottenuti su un gel di agarosio. Le bande di restrizione ottenute sono analizzate mediante un software di analisi ed eseguita una *cluster analysis* per raggruppare i ceppi analizzati in base alle omologie.

Batteri clonali producono profili identici, mentre batteri di origine diversa mostrano profili diversi tra loro. La somiglianza dei profili di PFGE rappresenta quindi il livello di omologia tra ceppi di origine diversa e tali comparazioni sono molto usate a scopo epidemiologico.

In questo studio si è applicata per la prima volta la tecnica del PFGE al sierotipo *Abortusovis* utilizzando l'enzima di restrizione *XbaI*. La tecnica del PFGE è risultata applicabile e ha consentito la discriminazione di ceppi batterici di origine diversa e l'individuazione di ceppi di origine clonale.

I risultati ottenuti ci hanno indotto ad estendere tale analisi a ceppi di *S. enterica* *Abortusovis* isolati in altre aree geografiche, per confrontarli con quelli isolati in centro Italia, al fine di verificare il potere discriminante della tecnica su ceppi di origine territoriale chiaramente diversa e di usare questo strumento per monitorare e descrivere la circolazione di particolari cloni epidemici nei vari siti ambientali e negli animali.

P40. TIPIZZAZIONE DI STIPITI DI SALMONELLA ENTERITIDIS E INFANTIS MEDIANTE SINGLE-ENZYME AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (SE-AFLP)

Caterina Mammina (a), Giovanni M. Giammanco (b), Antonino Nastasi (c)
(a) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Sezione di Igiene, Università degli Studi di Palermo;* (b) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Palermo;* (c) *Dipartimento di Sanità Pubblica "G.B. Morgagni", Università degli Studi di Firenze*

La SE-AFLP è una tecnica di tipizzazione basata sull'amplificazione genica (PCR) di DNA batterico digerito con un enzima di restrizione e sottoposto ad amplificazione selettiva grazie all'uso di oligonucleotidi "adapter" e di primer complementari agli adapter e con un nucleotide arbitrario finale. Questa tecnica, di esecuzione semplice e veloce, si è dimostrata altamente riproducibile e discriminativa per alcune specie di microrganismi. L'omogeneità genetica di alcuni sierotipi di Salmonella, in particolare *Enteritidis*, limita gravemente l'efficacia ai fini epidemiologici dei metodi di tipizzazione disponibili.

L'obiettivo è quello di allestire un protocollo semplice e rapido di SE-AFLP e valutarne riproducibilità e potere discriminativo su stipiti di *Salmonella Enteritidis* e *Infantis* provenienti da contesti epidemiologici definiti e già tipizzati con altri metodi fenogenotipici.

Il DNA genomico, sottoposto a una reazione combinata di restrizione enzimatica *HindIII*-ligasi, è stato amplificato con sequenze di oligonucleotidi, adapter e primer, descritte in letteratura. I primer sono stati utilizzati sia singolarmente, secondo il protocollo standard, sia in diverse combinazioni. I pattern di bande visualizzati dopo elettroforesi in gel di agarosio sono stati analizzati mediante il software *Taxotron* (Taxolab, Ist. Pasteur). Il potere discriminativo è stato valutato con il metodo di Hunter e Gaston.

L'analisi mediante SE-AFLP degli stipiti esaminati ha prodotto pattern di bande facilmente interpretabili e riproducibili. L'utilizzo simultaneo di misture di più primer incrementa proporzionalmente la complessità e varietà dei pattern ottenuti, rendendo la metodica molto competitiva rispetto ad altri metodi di tipizzazione molecolare.

CARATTERIZZAZIONE FENO-GENOTIPICA DI STIPITI DI *ENTEROCOCCUS* SPP. RESISTENTE AI GLICOPEPTIDI ISOLATI DA FONTE UMANA E ALIMENTARE

Caterina Mammina (a), Ivana Guida (a), Ludovico Conigliaro (a), Anna Maria Di Noto (b), Antonino Nastasi (c)

(a) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Sezione di Igiene, Università degli Studi di Palermo*

(b) *IZS della Sicilia, Palermo*

(c) *Dipartimento di Sanità Pubblica "G.B. Morgagni", Università degli Studi di Firenze*

Il ruolo della catena alimentare nell'emergenza dei GRE (*Glycopeptide Resistant Enterococci*) nei Paesi europei è un argomento ampiamente dibattuto, al quale lo studio delle relazioni epidemiologiche tra ceppi animali e umani può dare un contributo determinante.

L'obiettivo è quello di confrontare con metodi fenotipici e genetici gli stipiti identificati da casi di infezione nell'uomo con quelli isolati da alimenti di origine animale.

Gli stipiti da fonte umana provengono da Unità di Terapia intensiva di alcuni Ospedali palermitani. I campioni di carne suina, bovina e avicola sono stati prelevati in esercizi commerciali di varie dimensioni. L'isolamento di GRE da alimenti è stato effettuato mediante arricchimento selettivo e coltura su VRE agar (Oxoid). L'identificazione è stata effettuata con metodi biochimici e sierologici e la resistenza agli aminoglicosidi valutata con l'E-test. Una reazione di PCR multiplex è stata utilizzata per l'identificazione del genotipo *van*. L'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) è stata scelta come metodo di analisi genotipica. Infine, una Long-PCR con successiva restrizione enzimatica è stata utilizzata per l'analisi dei transposoni Tn1546.

I risultati ottenuti sono: a) nel periodo giugno 2003-giugno 2004 sono stati raccolti 12 stipiti di GRE di provenienza umana; b) 10 campioni alimentari su 75 (13,3%) analizzati hanno dato sviluppo di GRE con prevalenza dei campioni di carne avicola; c) un solo stipite è risultato *vanB*, mentre tutti gli altri *vanA*; d) dati preliminari sul confronto tra i ceppi indicano una spiccata eterogeneità dei pattern PFGE tra gli stipiti delle due fonti, alimentare e umana, con l'eccezione di un pattern condiviso; e) la PCR-RFLP di Tn1546 eseguita su 12 stipiti di GRE ha mostrato l'esistenza di tre pattern diversi, uno dei quali identificato in 10 stipiti di provenienza sia umana che alimentare.

In conclusione i risultati preliminari ottenuti su un numero limitato di stipiti confermano l'eterogeneità genetica degli stipiti di GRE già descritta da altri autori, ma suggeriscono anche la possibilità del trasferimento veicolato dagli alimenti di stipiti e di sequenze geniche trasponibili di resistenza dal comparto animale a quello umano.

P41. RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *E. COLI* /VTEC, EPEC ISOLATI NEL 2002 E 2003 DA VARIE SPECIE ANIMALI IN ITALIA

Stefano Morabito (a), Alessia Franco (b) Alessandro Fioravanti (a), Gessica Cordaro (b), Paola Di Matteo (b), Luigi Sorbara (b), Carmela Buccella (b), Cinzia Onorati (b), Tamara Cerci (b), Sarah Lovari (b), Alessandra Di Egidio (b), Antonio Battisti (b)
(a) Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Gli isolati esaminati in questo studio sono stati selezionati tra quelli pervenuti al Centro di Riferimento per *E. coli* dell'Istituto Superiore di Sanità tra il 2002 e il 2003 per la conferma e la caratterizzazione. Gli isolati sono stati saggiati per la presenza dei geni di virulenza codificanti l'intimina (*eae*) e le verocitotossine (VT). Settantatre isolati su 84 (86,9%) possedevano il gene *eae*, mentre l'82% di essi era produttore di Verocitotossina.

Gli isolati sono stati saggiati presso il Centro di Referenza per l'Antibiotico-resistenza nei confronti di panel specifici di antibiotici secondo le procedure standard della *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) sia con la metodica di agar diffusion sia con la metodica della MIC.

Sono stati testati 38 isolati provenienti da feci di bufalo, 28 provenienti da diverse matrici di bovino, 8 isolati provenienti da suino (7 provenienti da feci, 1 da insaccato), 6 isolati da coniglio e 4 isolati da feci di ovino. Per quanto il numero di isolati provenienti da alcune specie animali sia molto basso si nota come la proporzione degli isolati resistenti alle diverse molecole varii in rapporto alla specie zootecnica in oggetto e verosimilmente in ragione del regime di impiego delle diverse molecole nei diversi sistemi di allevamento. Le resistenze osservate negli isolati delle specie ovina e bufalina sono generalmente valori meno frequenti rispetto alle altre specie zootecniche (tra lo 0% e il 3%). Nel bovino sono stati ottenuti per molte molecole valori compresi tra il 4% e l'11%, non sono state riscontrate resistenze nei confronti di alcuni aminoglicosidi e dei fluorochinoloni; da segnalare anche un resistente alle cefalosporine di terza generazione. Il suino e il coniglio infine presentano le percentuali di resistenza più alte fino al 100% per molte molecole negli isolati provenienti dal coniglio.

PRESENZA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN PRODOTTI IMPORTATI DALLA GERMANIA E DISTRIBUITI IN ITALIA: LA TIPIZZAZIONE DEI CEPPI ISOLATI ESCLUDE LA RESPONSABILITÀ DELLA DISTRIBUZIONE

Ludwig Moroder (a), Agostino Carli (b)

(a) APPA Bolzano, Laboratorio Biologico;

(b) Servizio Veterinario, Azienda Sanitaria di Bolzano

Le analisi di laboratorio su alcuni campioni di preparazioni gastronomiche pronte per il consumo, in vendita presso un supermercato in Provincia di Bolzano (Italia), prelevati durante un controllo routinario dall'autorità sanitaria, hanno evidenziato la presenza di *Listeria monocytogenes* in 25 g di prodotto. Gli alimenti (formaggio fresco alle erbe, insalate varie) venduti sfusi nel bancone frigo, erano prodotti in un laboratorio della Germania e importati in vaschette sigillate da 1,5 kg. Un controllo ufficiale sulle vaschette di prodotto originali e sigillate, come anche l'autocontrollo effettuato dall'importatore, hanno evidenziato la presenza di *Listeria monocytogenes* in 25 g. In particolare, su un totale di 53 campioni, sono risultati positivi 12 campioni di prodotti diversi, come formaggio alle erbe, salsa bolzanina, patè di tonno, insalata di patate, insalata di aringhe, formaggio "Liptauer". I ceppi di *L. monocytogenes* isolati sia dai campioni sigillati che da quelli sfusi messi in vendita nei supermercati (in totale 12 ceppi) sono stati sierotipizzati e sottoposti a ribotipizzazione automatizzata con RiboPrinter. I pattern ottenuti hanno evidenziato la presenza di 2 ribogruppi distinti, corrispondenti ai 2 sierogruppi determinati. Degli 8 ceppi appartenenti al primo ribogruppo 206-S-1, 7 presentavano il sierotipo 1/2a, mentre un ceppo non era sierotipizzabile. I rimanenti 4 ceppi, appartenenti al ribogruppo 206-S-6, presentavano il sierotipo 1/2b.

Il ceppo isolato dal campione sfuso in vendita nel Supermercato A, appartenente al ribogruppo 206-S-6, era presente anche in un campione in vendita presso il supermercato B e in un campione sigillato prelevato al confine. Il ribogruppo prevalente 206-S-1, era presente nelle altre confezioni originali e in quella in vendita presso il Supermercato C.

Le analisi effettuate hanno dimostrato con sufficiente evidenza di poter tracciare la contaminazione da *Listeria monocytogenes* al produttore, escludendo quindi una contaminazione alla vendita al dettaglio. La ribotipizzazione automatizzata si è dimostrata un metodo veloce e utile per la genotipizzazione di *Listeria monocytogenes*.

Vi è stato inoltre un contenzioso rispetto ai limiti di legge per *L. monocytogenes* su alimenti pronti per il consumo in vigore in Italia e in Germania. Infatti mentre in Italia vige la tolleranza zero nei prodotti pronti al consumo (assenza in 25 g), in Germania è tollerata la presenza di *L. monocytogenes* se non supera al consumo le 100 ufc/g. Effettivamente, un'analisi quantitativa secondo il metodo ISO 11290-2 dei campioni positivi ha sempre evidenziato una contaminazione di *L. monocytogenes* <10 ufc, permettendo quindi al prodotto di circolare liberamente in Germania ma non in Italia. La ditta di produzione ha conseguentemente chiuso il mercato con l'Italia.

P42. TIPIZZAZIONE DEGLI ISOLAMENTI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN PROVINCIA DI BOLZANO IN CAMPIONI DI ORIGINE UMANA, ALIMENTARE E AMBIENTALE

Ludwig Moroder (a), Alberta Stenico (a), Dorotea Lombardo (b), Elisa Masi (b)
(a) APPA Bolzano, Laboratorio Biologico; (b) IZS delle Venezie, Bolzano

Il Laboratorio Biologico dell'APPA di Bolzano ha avviato, in collaborazione con l'IZS delle Venezie-Bolzano un programma di raccolta e tipizzazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati in Provincia di Bolzano. Gli isolamenti di origine umana, alimentare e ambientale vengono inviati al Laboratorio Biologico che ne conferma l'identificazione, effettua la tipizzazione sierologica con sieri polivalenti e monovalenti, la ribotipizzazione automatizzata con RiboPrinter® Qualicon e raccoglie e conserva gli stipiti nella ceppoteca per ulteriori indagini.

Dei 124 ceppi finora pervenuti e tipizzati, 106 provengono da campioni alimentari, 14 da campioni ambientali e 4 sono di origine umana. I ceppi di origine umana sono stati isolati da emocolture di pazienti ricoverati, fra i quali anche una donna deceduta. Per i campioni ambientali si tratta in primo luogo di tamponi dalle superfici degli ambienti di produzione, di preparazione o vendita al dettaglio di alimenti. Per quanto riguarda infine i campioni alimentari, gli isolamenti di *Listeria monocytogenes* provengono da matrici appartenenti alle seguenti tipologie: salsicce e salsicce stagionate (21), salse e insalate (15), prodotti di pasticceria (14), prodotti di gastronomia (10), panini tramezzini toast (9), impasti per salsicce (8), altre carni lavorate (8), vegetali (3), insaccati (3), macinato (2), carne fresca (2) salmone (1), tonno sfuso (1). Dei 120 stipiti non umani, 56 isolamenti provengono da esercizi di vendita al dettaglio, 36 dall'industria, 27 da esercizi pubblici e 1 da un privato.

L'analisi sierologica ha evidenziato la prevalenza del sierogruppo 1/2a, con il 46% degli isolamenti, seguito dai sierogruppi 1/2b (19%), 4b (15%), 1/2c (14%), mentre 6 ceppi non erano tipizzabili.

La ribotipizzazione ha evidenziato la presenza di 2 cluster principali. Nel primo confluiscono in prevalenza i sierogruppi 1/2b e 4b, mentre nel secondo cluster principale ricadono gli altri sierogruppi determinati 1/2a, 1/2c. Vi è quindi una buona correlazione fra i gruppi sierologici e i 2 cluster principali, con una evidente vicinanza genetica fra i sierogruppi 1/2b e 4b da una parte, e 1/2a e 1/2c dall'altra.

I 2 cluster principali si possono poi dividere a loro volta rispettivamente in 4 (A,B,C,D) e 4 (E,F,G,H) cluster secondari.

Nei cluster A e C prevale il sierogruppo 4b, nei cluster B e D il sierogruppo 1/2b. Il sierogruppo 1/2c compare assieme al sierogruppo 1/2a nei cluster E e G, mentre i cluster F e H raccolgono esclusivamente il sierogruppo 1/2a.

Per i ceppi umani, in particolare, 2 appartenevano al sierogruppo 1/2a, uno al sierogruppo 1/2b e uno al sierogruppo 4b.

CARATTERIZZAZIONE TRAMITE AUTOMATED RIBOTYPING E SIEROTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA CASI CLINICI UMANI, ANIMALI E DA DERRATE ALIMENTARI

Raffaella Nappi (a), Carla Grattarola (a), Roberto Serra (b), Lucia Decastelli (a), Adolfo Catalano (b), Monica Lo Faro (a), Francesca Gai (a), Angelo Ferrari (a), Maria Caramelli (a), Elena Bozzetta (a)

(a) Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, CEA.; (b) SCDO Microbiologia, ASO S. G. Battista, Torino

L'implementazione del sistema di sorveglianza delle neuropatologie animali legato all'epidemia di BSE, ha evidenziato come *L. monocytogenes* rappresenti il patogeno più frequentemente responsabile di sindromi neurologiche nei ruminanti; questo rilievo configura i ruminanti sia come bersaglio che come possibile veicolo di infezione. Il presente lavoro si propone di verificare l'esistenza negli alimenti e nei ruminanti degli stessi ceppi di *L. monocytogenes* che infettano l'uomo tramite caratterizzazione genetica e di valutare la concordanza tra i metodi di tipizzazione genetica (ribotipizzazione) e fenotipica (sierotipizzazione), ai fini della caratterizzazione ottimale dei ceppi di *L. monocytogenes*, soprattutto in corso di eventi epidemici. A questo scopo sono stati raccolti 35 ceppi di *L. monocytogenes* (17 isolati da animali, 9 dall'uomo e 9 da prodotti carnei) e ne è stata eseguita la caratterizzazione utilizzando le tecniche di Automated Ribotyping (RiboPrinter®) e Sierotipizzazione (Denka Seiken co., LTD, Japan). Nel nostro studio sono stati evidenziati i seguenti sierotipi: 4b (12), 4e (1), 1/2a (1), 1/2b (2), 1/2c (1) negli animali, 4d (2), 1/2a (3), 1/2b (4) nell'uomo; 1/2a (2), 1/2b (1), 1/2c (6) negli alimenti. I medesimi ceppi, sottoposti a ribotipizzazione, sono stati suddivisi in 13 ribogruppi, con indice di clusterizzazione del 37,1% (SID = 85,7%), dei quali i ribogruppi maggiormente rappresentati sono il 220-S-3, 220-S-2, 221-S-2 con rispettivamente 10, 8, 5 ceppi; inoltre i ribogruppi 220-S-2 e 221-S-2, comprendono ceppi isolati da uomo, animali e alimenti. I risultati confermano la prevalenza dei sierotipi 4b (isolato da campioni di origine animale), 1/2a e 1/2b (isolati da pazienti, animali e alimenti) e 1/2c (isolato prevalentemente da alimenti). La metodica del ribotyping, dimostra la presenza di ceppi prevalentemente di origine umana e di altri di origine animale; tuttavia, in due casi (220-S-2; 221-S-2), evidenzia la circolazione di ceppi comuni tra animali, uomo e alimento, configurando i ruminanti come serbatoio di infezione per l'uomo. Si osserva come la maggior parte dei ribogruppi non sia correlabile ad un unico sierotipo. Tuttavia la sierotipizzazione assegna la maggior parte dei ceppi di origine alimentare al sierotipo 1/2c, corrispondente al ribogruppo 220-S-2, mentre dei ceppi di origine animale, classificati nel sierotipo 4b, al ribogruppo 220-S-3. Infine, il ribogruppo 220-S-8 comprende ceppi esclusivi dell'uomo, corrispondenti al sierotipo 4d. Pertanto, la sierotipizzazione può essere utilizzata come screening preliminare di ceppi isolati da focolai epidemici, ma i ceppi di uno stesso sierotipo dovranno essere ulteriormente caratterizzati con metodiche molecolari, quali la ribotipizzazione.

P43. DISTRIBUZIONE A MOSAICO DI FATTORI DI VIRULENZA ASSOCIATI A PROFAGI IN UNA COLLEZIONE DI ISOLATI DI *S. ENTERITIDIS*

Francesca Pacello (a), Stefano Bilei (b), Anna Paola Salinetti (b), Gina Di Giampietro (b), Serena Ammendola (a), Giuseppe Rotilio (a), Andrea Battistoni (a)
(a) Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, (b) Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni-IZS delle Regioni Lazio e Toscana

La determinazione della sequenza nucleotidica completa del genoma di ceppi di *S. Typhi* e *S. Typhimurium* ha rivelato la presenza nei loro cromosomi di numerosi profagi funzionali e di altri frammenti incompleti di genomi fagici. Studi successivi hanno evidenziato che questi e altri profagi possono essere presenti, con combinazioni variabili, in altri ceppi e/o sierotipi di *S. enterica* e contribuire in modo significativo alla loro diversificazione. Particolarmente interessante è l'osservazione che la maggior parte dei profagi identificati in *Salmonella* è portatore di geni di virulenza che possono essere trasferiti tra diversi ceppi. Si ritiene, pertanto, che il riassortimento di tali geni tra diversi ceppi di *Salmonella* dovuto a processi di conversione lisogenica rappresenti un'importante forza guida nell'evoluzione della patogenicità di *Salmonella*, responsabile dell'insorgenza di nuovi cloni epidemici e dell'adattamento a nuovi ospiti animali.

Per intraprendere un'analisi delle relazioni tra profagi e patogenicità batterica, abbiamo analizzato una collezione di 20 ceppi di *S. Enteritidis* isolati da animali o alimenti per la presenza di geni di virulenza associati a profagi (*sodCI*, *gtgE*, *grvA*, *sopE*, *nanH*, *GipA*, *nanH*, *sodC3*). Questa analisi ha evidenziato che i diversi ceppi mostrano combinazioni altamente variabili di tali geni. Queste differenze, che non sono apparentemente correlate ad alterazioni del pulsotipo, possono essere attribuite sia ad un differente corredo profagico dei diversi ceppi che a processi di ricombinazione tra genomi virali. Tali ceppi sono stati inoltre analizzati per la loro resistenza a specie reattive dell'ossigeno (superossido e perossido di idrogeno), resistenza all'acidità e sopravvivenza in macrofagi murini. Anche se non è sempre possibile evidenziare una relazione diretta tra presenza di specifici geni di virulenza portati da profagi e resistenza ai diversi tipi di stress analizzati, i nostri studi hanno evidenziato che l'inattivazione di *sodCI* o la sua sovraespressione può influenzare in modo significativo la resistenza di alcuni ceppi di *S. Enteritidis* all'anione superossido, il prodotto primario del burst ossidativo dei fagociti. I nostri studi confermano che i processi di trasferimento genetico laterale mediato da batteriofagi svolgono un ruolo importante nella diversificazione dei ceppi di *Salmonella enterica*.

P44. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE (VTEC) DA CARNI LAVORATE MEDIANTE MULTIPLEX PCR E COLONY BLOT HYBRIDIZATION

Antonio Parisi (a), Salvatore G. Lanzilotta (a), Bruno Zotti (a), Giovanni Normanno (b), Nicoletta Addante (a), Angela Dambrosio (b)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano (BA);

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

I ceppi di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC) sono considerati importanti patogeni trasmessi da alimenti in quanto responsabili di gravi patologie, come la colite emorragica e la sindrome uremico emolitica. *E. coli* O157, poiché associato ai focolai di maggiori dimensioni, è il sierotipo principalmente investigato; tuttavia è attualmente riconosciuto che numerosi altri sierotipi sono in grado di produrre verocitotossine e di provocare malattia nell'uomo.

Nella malattia causata da questi microrganismi oltre alle verocitotossine intervengono altri fattori di virulenza; tra questi il fenotipo AE (*Attaching Effacing*) e la presenza di un plasmide che codifica l'enteroemolisina costituiscono quelli di maggiore interesse.

I bovini sono ritenuti i principali serbatoi di ceppi VTEC, anche se altre specie animali possano ospitarli nel tratto gastrointestinale. La principale fonte di infezione per l'uomo è costituita dalle carni contaminate durante le fasi di macellazione.

L'obiettivo del presente studio è mettere a punto un sistema per l'isolamento e la caratterizzazione di ceppi VTEC da carni lavorate. Sono stati analizzati 97 campioni di alimento prelevati alla vendita al dettaglio. Dopo una prima fase di arricchimento in brodo, i campioni sono stati sottoposti ad uno screening mediante multiplex PCR. Di questi, 13 sono risultati positivi per la presenza di almeno uno dei fattori di virulenza (*Stx1*, *Stx2*, *eaeA*, *hlyA*). I campioni positivi sono stati trasferiti su CT-SMAC e sottoposti al test di colony blot hybridization utilizzando sonde marcate con digossigenina.

Al fine di verificare il ruolo epidemiologico degli alimenti di origine animale quale fonte di infezione per l'uomo, alla luce della riconosciuta importanza dei sierotipi VTEC diversi dal sierotipo O157, appare interessante valutare la diffusione di questi stipiti nelle diverse matrici alimentari. Tuttavia, mentre sono disponibili protocolli di provata efficacia per l'isolamento e l'identificazione di *E. coli* O157 dagli alimenti e dai campioni clinici, risulta laborioso l'isolamento e l'identificazione dei sierotipi VTEC meno diffusi. Nel presente studio la multiplex PCR abbinata con la tecnica della colony blot hybridization ha consentito di individuare nel 13,4% (13/97) dei campioni analizzati la presenza di geni di virulenza e nel 9,3% (9/97) l'isolamento del ceppo verocitotossico.

Finanziamento ricerca corrente, Ministero della Salute

P45. ISOLAMENTO, CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI *CAMPYLOBACTER TERMOFILII* ISOLATI DA BOVINI E POLLAME IN PUGLIA

Antonio Parisi (a), Salvatore G. Lanzilotta (a), Angela Miccolupo (a), Cosimo O. Montagna (a), Girolamo Di Modugno (b), Nicoletta Quaglia (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Putignano (BA);

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

Campylobacter jejuni e *C. coli* sono attualmente considerati la principale causa di malattia gastro-intestinale in molti paesi del mondo. La maggior parte delle infezioni sostenute da tali microrganismi sono autolimitanti, anche se possono esitare in gravi complicazioni, come malattie articolari e la sindrome di Guillain Barré. La campylobacteriosi è considerata una zoonosi, e gli animali, in particolar modo il pollame, ma anche bovini, suini e animali da affezione possono fungere da serbatoi dell'infezione. I cibi contaminati, consumati senza un adeguato trattamento, costituiscono la principale via di contagio.

In questo studio, 11 aziende bovine, 8 aziende di galline ovaiole e 7 di broilers, sono state sottoposte a campionamento. Un numero variabile da 9 a 20 tamponi fecali sono stati prelevati da ciascuna azienda per un totale di 368 campioni. Tutte le aziende studiate risultavano positive per *Campylobacter* termotolleranti, mentre le percentuali di isolamento per le diverse tipologie di allevamento oscillava dal 43,7% (52/119) nei bovini, al 46,8% (51/109) nelle ovaiole al 65% (91/140) nei boiler. I ceppi isolati sono stati identificati mediante multiplex PCR e sottoposti a genotipizzazione mediante PCR-RFLP del gene flagellinaA e mediante Amplified Fragment Length Polymorphism. Tali tecniche consentivano di individuare la presenza di genotipi multipli, sia di *C. jejuni* che di *C. coli* in 10/15 aziende avicole e 8/11 aziende bovine. Negli ultimi anni si è assistito ad un notevole incremento della percentuale di stipiti resistenti ai più comuni antibiotici, in particolare nei confronti dei fluorochinoloni, antibiotici comunemente utilizzati nella terapia delle malattie gastro-intestinali umane. In accordo con i dati emersi dalla genotipizzazione sono stati selezionati 53 stipiti di *C. jejuni* e 22 di *C. coli*. Questi ceppi sono stati sottoposti alla valutazione della resistenza nei confronti 14 antibiotici. Complessivamente è stata registrata un'elevata percentuale di resistenza nei confronti dei fluorochinoloni (34%) e dell'associazione sulfometossazolo trimethoprim (80%), mentre livelli inferiori di resistenza sono stati registrati nei confronti dei macrolidi, rispettivamente 23% per *C. coli* e 3% per *C. jejuni*. L'indagine svolta conferma la notevole diffusione di questi microrganismi nei serbatoi animali. Lo studio di genotipizzazione condotto ha evidenziato come spesso all'interno dello stesso allevamento possano convivere diverse popolazioni di *Campylobacter*. I nostri dati, inoltre, forniscono un contributo per il monitoraggio dei fenomeni di resistenza agli antibiotici di questi microrganismi.

Finanziamento ricerca corrente, Ministero della Salute

P46. BIOTIPIZZAZIONE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA CONIGLI DA CARNE

Anna Maria Pisoni, Chiara Miggiano, Daniele Gallazzi, Guido Grilli
Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi, Milano

Le patologie gastro-enteriche del coniglio allevato rivestono grande importanza essendo responsabili della gran parte delle perdite in tale settore. *Escherichia coli* appartenente a ceppi EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*) è l'agente eziologico più frequentemente isolato da conigli con disturbi intestinali.

La nostra ricerca ha avuto origine dalla necessità di conoscere meglio le caratteristiche biochimiche dei vari ceppi EPEC (biotipi) e di evidenziare se queste siano correlate alla sensibilità agli antibiotici. A questo scopo da 150 conigli con enteropatia, provenienti da 20 allevamenti commerciali del nord Italia, sono stati isolati 60 ceppi di *E. coli*. Ogni ceppo isolato è stato identificato con il sistema API20E (BioMerieux), sottoposto alle prove di biotipizzazione suggerite da Camguilhem e Milon (1989) e successivamente testato per la sensibilità a 18 antibiotici mediante la metodica di Kirby-Bauer. Le analisi condotte sul profilo biochimico hanno messo in evidenza come i 60 ceppi isolati appartengano a 12 biotipi differenti, di cui quasi la metà rammosio negativi, indice di probabile presenza di geni di adesività *eae* che rende il ceppo particolarmente patogeno. Nel medesimo allevamento sono stati ritrovati da uno a 4 biotipi differenti; la presenza di più biotipi è stata correlata al costante acquisto da terzi di animali da rimonta, mentre l'allevamento con un unico biotipo si riforniva di seme selezionato per la rimonta interna, riducendo molto la probabilità di introdurre ceppi EPEC.

La valutazione dell'antibiotico-resistenza dei 60 *E. coli* testati ha mostrato alcune particolarità. In generale la resistenza agli antibiotici è risultata abbastanza elevata: 6 ceppi presentavano resistenza a più di 12 antibiotici, 9 ceppi a 11, 11 ceppi a 10, 14 ceppi a 9, 12 ceppi a 8 e solo 8 ceppi presentano resistenza a meno di 7 antibiotici. I principi attivi più efficaci si sono dimostrati i fluorochinoloni di nuova generazione, seguiti da colistina, flumequina, acido nalidixico e aminoglicosidi. Mediamente efficaci si sono dimostrati cloramfenicolo, polimixina B, aminosidina, tri-Sulfamidico e co-trimossazolo; poco efficaci o del tutto inutilizzabili cicline e sulfadiazina. Nel medesimo allevamento, ceppi di *E. coli* con profilo biochimico differente presentano una sensibilità diversa, comunque correlabile al biotipo; ceppi dello stesso biotipo, però provenienti da allevamenti diversi, hanno invece una sensibilità non correlabile; ciò induce a pensare che l'antibiotico-resistenza sia anche indotta e non solo genetica.

La presenza di biotipi differenti e l'elevata resistenza agli antibiotici consigliano ulteriori indagini sui ceppi EPEC (sierotipizzazione, presenza dei geni di adesività) presenti negli allevamenti italiani e negli animali provenienti da Paesi esteri importati come riproduttori.

P47. STIMA DELL'INCIDENZA DELLA LISTERIOSI IN LOMBARDIA NEGLI ANNI 1996-2003

Mirella Pontello (a), Elisabetta Alliaia (b)

(a) *Istituto di Igiene, Università degli Studi di Milano*

(b) *Istituto di Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Milano*

La listeriosi è una malattia infettiva a prevalente trasmissione alimentare, con elevato tasso di letalità e che può manifestarsi in forma epidemica; i focolai possono risultare di non facile riconoscimento dato il lungo periodo di incubazione (anche diverse settimane) e anche in considerazione della grande varietà di alimenti implicati e dell'attuale complessità delle filiere di produzione/distribuzione alimentare.

In Italia la listeriosi è una malattia soggetta a notifica obbligatoria secondo il DM 15/12/1990; i criteri di notifica sono rappresentati dalla presenza di sintomi clinici e dall'isolamento di *L. monocytogenes* da un sito normalmente sterile. Così come per altre malattie soggette a denuncia obbligatoria, il verificarsi di un'eventuale sottonotifica può impedire sia una corretta descrizione dell'epidemiologia sia l'adozione di misure preventive. Inoltre, anche se gli studi italiani dimostrano una diffusa contaminazione alimentare e ambientale da parte di *L. monocytogenes*, del tutto sovrapponibile a quella documentata dalla Letteratura internazionale, in base ai dati di notifica l'incidenza della malattia in Lombardia, e ancor più a livello nazionale, risulta minore di quella degli altri Paesi e anche il numero delle epidemie segnalate è inferiore. Al fine di stimare la sottonotifica e di calcolare la reale incidenza della listeriosi in Lombardia, è stato applicato per il periodo 1997-2003 il metodo cattura-ricattura, utilizzando due fonti informative rappresentate dalle notifiche e dalle schede di dimissione ospedaliera.

Le notifiche non raggiungono mai un valore di completezza pari al 50%, in particolare risultano non identificati gli isolamenti in partorienti al momento del ricovero. Il tasso di incidenza calcolato per la listeriosi in Lombardia (0,6 casi ogni 100.000 abitanti) è risultato sovrapponibile a quello riportato dalla maggioranza degli altri Paesi europei e non sono stati rilevati cambiamenti sostanziali nei sette anni considerati. L'analisi dei dati ha inoltre permesso di evidenziare un focolaio epidemico non rilevato dai Servizi di igiene pubblica.

Entrambe le fonti informative sottostimano la reale incidenza della malattia; inoltre, da esse non è stato possibile risalire ad alcune importanti informazioni relative alla forma clinica (sepsi, meningite, ecc.), alla sede dell'isolamento e al sierotipo; quest'ultimo dato permetterebbe il confronto tra la frequenza dei diversi sierotipi isolati dagli alimenti e quella osservata per i ceppi implicati nell'insorgenza di patologia nell'uomo.

Data la gravità della malattia e data la necessità di riconoscere tempestivamente l'associazione tra casi di malattia e veicolo alimentare, si ritiene utile l'attivazione di uno specifico programma di sorveglianza con il fine di ottenere un riscontro più veritiero della reale incidenza della patologia e di chiarire meglio alcuni aspetti dell'epidemiologia (l'insorgenza di forme materno-fetali, la presenza di focolai epidemici e la correlazione con la contaminazione degli alimenti) con l'obiettivo di rendere possibili gli interventi preventivi.

P48. MULTIPLEX-PCR PER IL RILIEVO E LA CARATTERIZZAZIONE DI *HELICOBACTER PYLORI* NEL LATTE OVI-CAPRINO

Nicoletta Cristiana Quaglia (a), Angela Dambrosio (a), Giovanni Normanno (a), Antonio Parisi (b), G. Livio Germinario (c), Gaetano Vitale Celano (a)

(a) *Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Bari;* (b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Putignano;*(c) *AUSL Bari 2 Barletta, Bari*

Helicobacter pylori (*HP*) è una delle più comuni cause di infezioni croniche ad eziologia batterica nell'uomo ed è stato recentemente associato alla presenza e allo sviluppo dell'adenocarcinoma gastrico e del linfoma gastrico tipo MALT. Le modalità di infezione non sono completamente note e si ipotizzano diversi meccanismi di contagio anche se il più accreditato sembra essere quello oro-fecale. Inoltre, diversi *autori*, considerano *HP* un vero e proprio patogeno a veicolo alimentare, in quanto il microrganismo è stato isolato da acqua potabile, latte ovino e bovino. Un'altra considerazione è relativa alla comprovata capacità di sopravvivenza di *HP* nelle matrici alimentari complesse come il latte e in alimenti *ready to eat*. L'isolamento di *HP* dagli alimenti è indaginoso e richiede tempi lunghi talvolta incompatibili con l'analisi routinaria, per cui diversi AA. hanno proposto l'impiego di tecniche di biologia molecolare per rilevare il microrganismo nell'acqua e in diverse matrici alimentari.

È noto che sono considerati particolarmente patogeni per l'uomo i genotipi di *HP* che possiedono specifici *markers* di virulenza come il gene *vacA*, che a sua volta può presentare due varianti alleliche, s1/m1 e s2/m2, che codifica la citotossina vacuolizzante VacA. Un altro *marker* di virulenza è rappresentato dal gene *cagA*, che codifica per la proteina CagA. La valutazione sanitaria di un alimento contaminato da *HP* non può pertanto prescindere dalla genotipizzazione dell'isolato. In questa nota gli autori riportano una metodica multiplex-PCR per identificare e genotipizzare *HP* direttamente da latte ovino contaminato artificialmente e applicano la metodica a 18 campioni di latte ovino e a 20 campioni di latte caprino di campo. La tecnica si è rilevata sensibile, specifica e rapida e ha consentito di mettere in evidenza i determinanti genetici ricercati in 2 campioni di latte caprino.

P49. CONFRONTO TRA TECNICHE TRADIZIONALI E MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI CAMPYLOBACTER SPP. IN CAMPIONI DI CARNE

Giancarlo Ripabelli (a), Incoronata Fanelli (a), Michela Lucia Sammarco (a), Ida Luzzi (b)
(a) Dipartimento di Scienze per la Salute, Università degli Studi del Molise, Campobasso;
(b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le infezioni da *Campylobacter* spp. rappresentano una delle cause più frequenti di enterite nel mondo. Lo scopo della ricerca è stato quello di confrontare: 1) il CCDA *selective agar* e la tecnica di filtrazione su membrana per l'isolamento di *Campylobacter* spp. da campioni di carne; 2) i metodi fenotipici e molecolari per l'identificazione del *Campylobacter* spp. Sono stati analizzati 352 campioni di carne di bovino, pollo e suino acquistati in punti vendita della città di Campobasso. Tali campioni sono stati esaminati per la ricerca di *Campylobacter* spp. con due procedure distinte: dopo arricchimento in Preston Broth, le colture sono state inoculate su CCDA agar e, in parallelo, alcune gocce di brodo sono state filtrate attraverso una membrana di cellulosa con porosità di 0,45 µm appoggiata su agar sangue. Le colonie sospette sono state identificate a livello di genere e specie mediante test biochimici (ossidasi, catalasi, idrolisi indoxyl-acetato, idrolisi dell'ippurato e DNAsi) e mediante PCR per frammenti dei geni 16SrRNA (*Campylobacter* spp.), *mapA* (*C. jejuni*) e *ceuE* (*C. coli*). I ceppi identificati fenotipicamente come *Campylobacter* spp. sono stati isolati da 80 (22,7%) campioni: 38 (10,8%) con entrambi i metodi microbiologici, 31 (8,8%) solo con l'uso del terreno selettivo e 11 (3,1%) solo con la filtrazione. Settantaquattro degli 80 isolati sono stati confermati come *Campylobacter* spp. mediante l'uso della PCR (gene 16SrRNA). I sei ceppi non confermati provenivano dal CCDA. Mediante fenotipizzazione *C. jejuni* è stato identificato in 43 campioni, *C. coli* in 36, mentre un solo campione conteneva entrambe le specie. I risultati di speciazione con metodi fenotipici sono stati tutti confermati mediante la PCR eccetto per due ceppi di *C. coli* identificati molecolarmente come *C. jejuni*. Il terreno selettivo CCDA ha permesso l'isolamento di una percentuale maggiore di colonie di *Campylobacter* spp. rispetto alla filtrazione su membrana, sebbene tutti i sei ceppi non confermati molecolarmente provenivano proprio dal terreno selettivo. È probabile che la selezione fisica della membrana permette di ottenere risultati più specifici, malgrado mostri una più bassa sensibilità. La bassa attività biochimica e la conseguente variabilità nei risultati dei test può rendere incerta l'identificazione di *Campylobacter* spp. Le difficoltà maggiori possono essere incontrate nella differenziazione tra *C. jejuni* e *C. coli*. Infatti, l'idrolisi dell'ippurato, positiva solo per *C. jejuni*, può dar luogo a risultati non ben definiti e, pertanto, dipendenti dall'interpretazione dell'operatore. I metodi molecolari, la PCR in particolare, hanno rappresentato un importante passo avanti per la diagnostica dei batteri. Infatti, il sequenziamento e la PCR dei geni 16SrRNA e 23SrRNA sono ampiamente usati per l'identificazione della specie. Quindi, una combinazione tra metodi biochimici e molecolari rappresenta sicuramente la scelta più appropriata per una accurata e attendibile identificazione di *Campylobacter* spp.

P50. LA SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN PUGLIA (MARZO 2002-APRILE 2003)

Caterina Rizzo, Giovanna Ceci, Maria Francesca Coscia, Donatella Rizzi, Susi Epifani,
Danila De Vito
*Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni (Enter-net Puglia), Università di
Bari*

Listeria monocytogenes è un microrganismo intracellulare, ubiquitario che colpisce soprattutto soggetti immunocompromessi come gli anziani, i trapiantati, pazienti in dialisi, HIV positivi. Le donne sono particolarmente a rischio durante la gravidanza in quanto l'immunità cellulo mediata si riduce notevolmente. Si descrivono 10 casi di listeriosi verificatisi in soggetti residenti in diverse provincie della regione Puglia.

Ceppi di *L. monocytogenes* sono stati isolati secondo i protocolli standard da differenti materiali clinici. I dati riguardo i sierotipi di appartenenza, l'antibiotico-resistenza e le informazioni cliniche sono stati analizzati con il software Epi-Info 6.4.

Da marzo 2002 ad aprile 2003, 10 casi di listeriosi sono stati segnalati al Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni. Sette ceppi di *L. monocytogenes* sono stati isolati da emocolture e 3 da liquor coltura. Infezioni neonatali (2 casi di prematurità e 1 caso di aborto spontaneo) e setticemia in adulti (2 casi) e anziani (1 caso) sono stati i più frequenti quadri clinici, seguiti da casi di meningite in adulti (4 casi). Il 70% dei pazienti presentavano una condizione predisponente l'insorgenza della patologia invasiva. I sierotipi dei ceppi isolati erano: il 4ab (4/10) e l'1/2b (4/10), seguiti dal sierotipo 1/2a (2/10). I ceppi sono risultati sensibili ai principali antibiotici utilizzati in terapia.

Nel periodo di osservazione si è assistito ad un repentino aumento della incidenza di casi di listeriosi in Italia. Nello stesso periodo anche in Francia sono stati osservati dei cluster epidemici. Nessun altro caso dall'aprile 2004 è stato segnalato al Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni, il che conferma la natura sporadica dell'evento. Sono in corso indagini di epidemiologia molecolare mediante PFGE per stabilire la possibile fonte comune della infezione e la provenienza dei microrganismi.

P51. YERSINIA ENTEROCOLITICA: ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DI CEPPI ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE NELLA REGIONE UMBRIA

Stefania Scuota (a), Silvia Cibotti (a), Alessia Zicavo (a), Telemaco Cenci (a), Ida Luzzi (b)
(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia; (b) Istituto Superiore di Sanità, Roma

Vengono riportati i dati relativi agli isolamenti di *Yersinia enterocolitica* in campioni esaminati dall'IZSUM nell'ambito del Piano Triennale Alimenti della Regione Umbria. La percentuale media di contaminazione delle carni e derivati riscontrata negli anni 2001, 2002 e 2003 era compresa fra lo 0,5 e l'1%. Nei primi mesi del 2004 si è assistito ad un aumento significativo degli isolamenti di *Yersinia enterocolitica* da carni suine fresche o lavorate (oltre il 10%). Gli alimenti contaminati da *Yersinia enterocolitica*, riferiti al I quadrimestre 2004, erano costituiti da preparazioni di carne di suino, carni fresche di suino e prodotti a base di carne di suino, prelevati in aziende o esercizi distribuiti in distretti regionali diversi. Nello stesso periodo non sono state notificati, dagli ospedali regionali, casi di gastroenterite sostenuti da *Yersinia enterocolitica*. I ceppi isolati dagli alimenti sono risultati appartenere a sierogruppi diversi. L'elettroforesi pulsata, effettuata su tutti i ceppi isolati, non ha evidenziato significative correlazioni all'interno di uno stesso sierogruppo. Tali risultati portano ad escludere un'origine comune dei ceppi circolanti.

P52. ANALISI DELLA DIFFUSIONE DI GENI DI RESISTENZA ANTIBIOTICA DI SALMONELLA ENTERICA SIEROTIPO TYPHIMURIUM FAGOTIPO DT104 E FAGOTIPI CORRELATI MEDIANTE UN SAGGIO DI PCR MULTIPLEX

Monica Staffolani, Stefano Fisichella

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Macerata, Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni

Il fenomeno della multiresistenza è in aumento in tutto il mondo e riguarda soprattutto alcuni generi batterici tra cui *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Salmonella*.

Le infezioni causate da *Salmonella* continuano ad aumentare sia in campo veterinario che in campo umano in tutto il mondo così come aumentano ogni anno i sierotipi che presentano resistenza antibiotica multipla.

In particolare *S. Typhimurium* fagotipo DT104 da circa un decennio sta ponendo un grave problema di sanità pubblica a causa dell'integrazione cromosomica di geni di resistenza multipla agli antibiotici. Per questo molti autori hanno messo a punto test rapidi basati su tecniche di biologia molecolare per la rivelazione dei ceppi multiresistenti di *S. Typhimurium* DT104, utili per il monitoraggio e per approfondire la conoscenza e l'epidemiologia dei geni di resistenza antibiotica.

In questo lavoro è stato valutato un saggio di PCR multiplex che amplifica un segmento di DNA all'interno dell'isola genomica 1 di *Salmonella* (SGI1) contenente due geni di resistenza antibiotica (PSE-1 e floR) piuttosto specifici di *S. Typhimurium* DT104 con resistotipo ACSSuT/ASSuT. Originariamente tale saggio era stato messo a punto per rivelare in modo specifico il fagotipo DT104 ma alcuni autori hanno ottenuto risultati discordanti in quanto il test sembra capace di rivelare anche altri fagotipi correlati a DT104.

In questo lavoro il saggio di PCRm in questione è stato testato su 84 ceppi di *Salmonella* conservati presso la ceppoteca del Centro di Riferimento Regionale e isolati nella regione Marche dal 1997 al 2004. Tra questi sono stati inclusi 75 ceppi multiresistenti e 9 ceppi non resistenti usati come controllo negativo. I 75 ceppi multiresistenti comprendono in maggioranza i sierotipi che attualmente occupano i primi tre posti in frequenza in ambito umano: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *Salmonella monofasica* 4,5,12:i:- (isolata per la prima volta in Spagna nel 1997 e poi riscontrata in Europa e negli USA).

I nostri risultati dimostrano che il saggio in questione può essere considerato un metodo valido e ripetibile per la rivelazione dei ceppi di *S. Typhimurium* DT104 multiresistenti o di altri fagotipi strettamente correlati, e pertanto risulta a nostro avviso non tanto utile per la sua specificità, quanto come mezzo per studiare la mobilità e tracciare la diffusione della SGI1 tra gli isolati multiresistenti di *Salmonella*.

CIRCOLAZIONE IN ITALIA DI UN CLONE DI *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VANCOMICINO-RESISTENTE ISOLATO DAL SANGUE

Lucia Stampone, Maria Del Grosso, Delia Boccia, Annalisa Pantosti
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Gli enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) sono un'importante causa di infezioni nosocomiali, in particolare negli USA. In Europa, fino agli anni 90, i VRE sono stati isolati soprattutto da animali da allevamento e da portatori sani a livello intestinale. Tuttavia negli ultimi anni si è avuto un incremento di VRE isolati da infezioni; in Italia la percentuale di VRE isolati dal sangue è una delle più alte in Europa. Obiettivo di questo studio è stato caratterizzare ceppi di VRE isolati dal sangue in pazienti ricoverati in ospedali di diverse aree italiane e analizzare la relazione clonale fra i ceppi.

Nel periodo 2001-2003 sono stati raccolti 39 VRE provenienti da 18 laboratori ospedalieri. L'identificazione di specie e il genotipo di resistenza alla vancomicina sono stati ottenuti mediante un saggio di PCR multipla. Le sensibilità agli antibiotici sono state saggiate mediante microdiluzione in brodo. La caratterizzazione molecolare dei ceppi è stata realizzata mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e rilevazione dei geni di virulenza (*esp*, *hyl*) mediante saggio di PCR.

Dei 39 ceppi esaminati 31 appartenevano alla specie *E. faecium* (*E.fm*) e 8 alla specie *E. faecalis* (*E.fl*). Tutti, tranne uno, portavano il gene *vanA*, mentre un ceppo di *E.fm* portava il gene *vanB*. L'analisi dei ceppi di *E.fm* mediante PFGE ha messo in evidenza 4 pulsotipi distinti: 28 isolati avevano un profilo elettroforetico identico o molto simile e quindi appartenevano ad uno stesso clone; inoltre erano tutti resistenti ad ampicillina, streptomina, gentamicina, eritromicina e rifampicina e risultavano positivi per il gene di virulenza *esp*. Gli altri 3 isolati mostravano pulsotipi e pattern di resistenza differenti, incluso il ceppo portatore del gene *vanB*. I ceppi di *E.fl* mostravano profili elettroforetici differenti fra di loro. Il gene *hyl* non è stato rilevato in nessuno dei 39 ceppi studiati. L'analisi MLST di 4 ceppi di *E.fm* appartenenti al clone ha messo in evidenza un profilo allelico corrispondente al sequence type (ST) 78. Il ceppo portatore del gene *vanB* presentava un nuovo ST con una variante in un singolo allele rispetto al ST78. Il ST78 rientra nella sublinea genetica C1 caratteristica di ceppi ospedalieri avente distribuzione mondiale.

In conclusione, questi dati mostrano che in Italia il recente incremento del numero di VRE isolati dal sangue potrebbe essere dovuto alla circolazione di un clone multiresistente ben adattato all'ambiente ospedaliero e appartenente alla stessa linea genetica diffusa in tutto il mondo.

P53. DISTRIBUZIONE DI TOXB, UN GENE DI VIRULENZA DI E. COLI O157, IN CEPPI DI ESCHERICHIA COLI “ATTACHING AND EFFACING”

Rosangela Tozzoli, Stefano Morabito, Alfredo Caprioli
Istituto Superiore di Sanità, Roma

I ceppi di *E. coli* O157 e altri *E. coli* “Attaching and Effacing” (AEEC) sono batteri in grado di provocare patologie enteriche nell’uomo e negli animali. La patogenicità di questi batteri è dovuta alla presenza di determinanti di virulenza veicolati da elementi genetici mobili tra cui l’isola di patogenicità LEE e i batteriofagi codificanti le verocitotossine. Oltre a questi fattori di virulenza, la patogenesi delle infezioni sostenute da questi microrganismi coinvolge altri determinanti. Alcuni di questi geni sono localizzati su un grande plasmide di virulenza e comprendono *katP* che codifica una catalasi-perossidasi, *espP* che codifica una serina proteasi e un gene di circa 10 Kb, *toxB*, il cui prodotto sembra interferire con la risposta linfocitaria dell’ospite e aumentare la capacità di adesione del batterio su colture cellulari. L’intera sequenza codificante di questo gene è stata evidenziata, finora, solo nei due ceppi di *E. coli* O157 completamente sequenziati, tuttavia, utilizzando una strategia basata sulla visualizzazione di un frammento di 600 bp della sequenza codificante, la presenza di questo gene è stata estesa ad isolati di AEEC appartenenti ai sierogruppi O121, O26, O103 e O145.

Lo scopo di questo lavoro è stato di esaminare la distribuzione di *toxB* utilizzando una strategia basata sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) atta ad individuare regioni diverse della sequenza del gene in un pannello di ceppi AEEC di diversi sierogruppi. La strategia utilizzata prevedeva reazioni di amplificazione con tre coppie di oligonucleotidi che riconoscono altrettante regioni del gene *toxB*.

In totale, 99 ceppi sono stati saggiati, questi comprendevano 60 stipiti produttori di verocitotossina, di cui 23 appartenevano al sierogruppo O157. Come atteso, tutti i 23 ceppi O157 sono risultati positivi in tutte le reazioni, generando ampliconi delle dimensioni attese. Per quanto riguarda gli altri sierogruppi esaminati, 10/21 AEEC O26 erano positivi con tutte e tre le coppie di primers, mentre altri sei isolati appartenenti a questo sierogruppo sono risultati positivi con almeno una delle tre coppie di primers utilizzate. Inoltre pochi ceppi appartenenti a sierogruppi O111, O86, O118, O127, O121, O123 e O145 erano positivi in almeno una delle tre reazioni di PCR.

I nostri risultati mostrano che *toxB* è presente in tutti gli *E. coli* O157. I dati ottenuti, inoltre, estendono questa osservazione a ceppi appartenenti ad altri sierogruppi e mostrano una forte associazione di *toxB* con i ceppi di sierogruppo O26.

P54. SELEZIONE DI BATTERIOFAGI LITICI ATTIVI CONTRO *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

Maurizio Viscardi, Federico Capuano, Domenico Fenizia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale per il Mezzogiorno, Portici, Napoli

I batteriofagi sono virus che infettano i batteri, utilizzano la cellula ospite per riprodurre la propria progenie; il rilascio di quest'ultima comporta la lisi della cellula batterica (fagi litici). Scoperti all'inizio del secolo scorso, furono utilizzati come agenti antibatterici fino alla diffusione degli antibiotici. La terapia fagica è stata recentemente rivalutata dalla medicina occidentale data l'efficacia dimostrata da batteriofagi verso batteri patogeni multi-antibiotico resistenti.

Il nostro patogeno target è stato *Escherichia coli* O157:H7. Isolato all'inizio degli anni ottanta, *Escherichia coli* O157:H7 è attualmente considerato un patogeno emergente. Si registrano ogni anno, solo negli Stati Uniti, circa 73.000 casi di infezione, di cui oltre 60 sono letali. L'infezione, che è associata al consumo di alimenti infetti, in genere carne o vegetali, provoca diarree, coliti emorragiche, anche con conseguenze gravi quali sindrome uremica emolitica (HUS).

In questo lavoro abbiamo isolato e caratterizzato fagi litici attivi contro ceppi STEC di *E. coli* in particolare *E. coli* O157:H7. Attraverso protocolli di selezione ne abbiamo migliorato l'attività litica e terapeutica in vivo, valutandone l'utilizzo nel caso di infezione sistemica acuta in topo. Un ulteriore utilizzo di questi fagi potrebbe essere quello del controllo a livello ambientale di questi patogeni ad esempio la diffusione negli allevamenti zootecnici attraverso la lettiera degli animali, nel tentativo di ridurre le potenziali fonti di immissione di questi patogeni nella catena alimentare. Ancora si valuta il loro utilizzo nella sanitizzazione di carcasse animali da destinare al consumo, di vegetali e frutta realizzando un biocontrollo non tossico ed efficace dei patogeni.

I fagi selezionati sono stati caratterizzati mediante microscopia elettronica e RAPD-PCR.

P55. SENSIBILITÀ DI *CAMPYLOBACTER* SPP. ISOLATI DA CANI E GATTI NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA

Renato Giulio Zanoni, Domenica Giacomucci, Mirko Rossi, Sandra Ibañez Vela, Valeria Sanguinetti

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi di Bologna

È stato condotto uno studio di MIC mediante diluizione in agar di otto antibiotici su 24 *Campylobacter jejuni*, 38 *C. upsaliensis* e 16 *C. helveticus* isolati da feci di cani e gatti nel 2002. Le MIC sono state eseguite secondo la procedura standard proposta dall'NCCLS (Doc.M31-A2) impiegando come controllo qualità il ceppo di *C. jejuni* ATCC 33560. Alla metodica sono state apportate le seguenti modifiche: impiego di microaerofilia con idrogeno per gli isolati di *C. upsaliensis* e *C. helveticus*, sostituzione del Mueller-Hinton con Nutrient Broth n°2 (Oxoid) agarizzato per *C. helveticus* e lettura delle prove a 48 ore. Sono stati utilizzati per sei molecole i breakpoints indicati dall'NCCLS per le *Enterobacteriaceae* nell'uomo, per l'enrofloxacin quello definito per le *Enterobacteriaceae* nel cane e nel gatto e per l'eritromicina è stato impiegato il breakpoint di 38 µg/mL. Tutti gli isolati di *C. jejuni* sono risultati non resistenti alla gentamicina (MIC90 1 µg/mL) e alla eritromicina (MIC90 4 µg/mL). Un solo isolato è risultato resistente al cloramfenicolo (MIC90 16 µg/mL), il 12% sono risultati resistenti all'ampicillina (MIC50 4 µg/mL; MIC90 64 µg/mL), il 37% alla tetraciclina (MIC50 0,5 µg/mL; MIC90 64 µg/mL), il 58% alla ciprofloxacina (MIC50 16 µg/mL; MIC90 64 µg/mL), il 58% all'enrofloxacin (MIC50 4 µg/mL; MIC90 1 µg/mL) e il 62% all'acido nalidixico (MIC50 64 µg/mL; MIC90 256 µg/mL). Gli isolati di *C. upsaliensis* sono risultati non resistenti alla gentamicina (MIC90 0,25 µg/mL), all'eritromicina (MIC90 4 µg/mL), al cloramfenicolo (MIC90 8 µg/mL) e alla tetraciclina (MIC90 0,5 µg/mL). L'8%, degli isolati, invece, sono risultati resistenti all'ampicillina (MIC50 1 µg/mL; MIC90 16 µg/mL), all'acido nalidixico (MIC50 8 µg/mL; MIC90 128 µg/mL), alla ciprofloxacina (MIC50 0,25 µg/mL; MIC90 0,5 µg/mL) e all'enrofloxacin (MIC50 0,06 µg/mL; MIC90 0,12 µg/mL). Gli isolati di *C. helveticus* non hanno mostrato resistenza alla gentamicina (MIC90 0,5 µg/mL), alla tetraciclina (MIC90 0,06 µg/mL), al cloramfenicolo (MIC90 8 µg/mL) e all'ampicillina (MIC90 2 µg/mL). Tre isolati sono risultati resistenti all'eritromicina (MIC50 2 µg/mL; MIC90 16 µg/mL), di cui uno anche alla ciprofloxacina (MIC90 0,25 µg/mL), alla enrofloxacin (MIC90 0,06 µg/mL) e all'acido nalidixico (MIC90 4 µg/mL). I dati riguardanti *C. jejuni*, specie di maggior rilevanza in sanità pubblica, indicano una preoccupante resistenza ai chinoloni. I risultati inerenti *C. upsaliensis* indicano, invece, uno scenario meno allarmante per questi antibiotici. Del tutto rassicurante la situazione di *C. helveticus*, batterio il cui ruolo negli animali non è del tutto chiarito e che attualmente non è correlato a patologie umane. La difficoltà di comparare gli scarsi dati presenti in letteratura, relativi al cane e al gatto, con quelli da noi ottenuti è dovuta alla mancata applicazione del metodo proposto dall'NCCLS.

Quarta sessione
Infezioni virali e parassitarie

P56. VARIABILITÀ GENETICA DI VP7 E VP4 IN ROTAVIRUS G4 IN BAMBINI PALERMITANI

Serenella Arista (a), Giovanni M. Giammanco (a), Simona De Grazia (a), Vito Martella (b),
Claudia Colomba (c)

(a) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università di Palermo*; (b) *Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università di Bari*; (c) *Istituto di Patologia Infettiva e Virologia, Università di Palermo*

Nel corso degli anni 1990-2003, sono stati sierotipizzati, con l'ausilio di anticorpi monoclonali nei confronti della proteina capsidica VP7, 1407 ceppi di *Rotavirus*, ottenuti da bambini, di età inferiore ai 5 anni, ospedalizzati a Palermo per enterite. Duecentocinquantaquattro ceppi esibivano un sierotipo G4, la cui frequenza annuale mostrava ampie fluttuazioni. *Rotavirus* di tipo G4 sono una comune causa di diarrea infantile in Italia e nel mondo, insieme ai tipi G1-G3 e G9. Dal momento che numerosi studi sono attualmente in corso per la formulazione di un vaccino antirotavirus, si è voluto analizzare la variabilità ed evoluzione antigenica dei nostri ceppi G4. A tal fine, 23 ceppi, distribuiti uniformemente nel periodo analizzato, sono stati selezionati e caratterizzati mediante amplificazione (RT-PCR) e sequenziamento delle regioni codificanti per le due proteine virali del capsido esterno VP7 e VP4, entrambe inducenti anticorpi neutralizzanti.

Dal confronto delle sequenze di VP7 è stato possibile distinguere i ceppi G4 siciliani in tre gruppi: uno contenente quelli più antichi, isolati dal 1990 al 1994, un secondo quelli del 1995, e il terzo i più recenti, ottenuti dal 1999 al 2003. Questi ultimi esibivano nella sequenza aminoacidica l'inserzione di una asparagina in posizione 76, già riscontrata in ceppi argentini nel 1998 e uruguaiani nel 1999.

In base a VP4 tutti i nostri ceppi erano di genotipo P[8] ed esibivano, in seguito ad analisi della sequenza nucleotidica, una distribuzione temporale in due gruppi, uno comprendente quelli più antichi (1990-1994), l'altro i più recenti (1995-2003). La stessa distinzione temporale è stata osservata in ceppi P[8] appartenenti a *Rotavirus* di sierotipo G1 e G9, circolanti a Palermo nello stesso periodo. La variabilità riscontrata nei geni VP7 e VP4 dei nostri ceppi è probabilmente da attribuire non solo all'insorgenza di mutazioni puntiformi ma anche ad eventi di riassortimento genico.

I risultati ottenuti forniscono informazioni utili per la formulazione di un vaccino efficace per la prevenzione delle diarreie da *Rotavirus* nella popolazione infantile italiana.

P57. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ROTAVIRUS DI GRUPPO A ISOLATI DA BOVINI IN ITALIA SETTENTRIONALE

Patrizia Battista (a), Marina Monini (a), Ilaria Di Bartolo (a), Emiliana Falcone (a), Antonio Gavazza (b), Franco Maria Ruggeri (a)

(a) Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

I *Rotavirus* di gruppo A sono riconosciuti come i più importanti agenti eziologici virali di gastroenterite nei bambini e negli animali. Le proteine VP4(P) e VP7(G), che costituiscono il capsido esterno virale, sono entrambe coinvolte nell'induzione della risposta protettiva e sono presumibilmente sottoposte a pressione selettiva da parte della risposta immunitaria. Pertanto, la caratterizzazione antigenica o molecolare dei geni 4 e 9, codificanti rispettivamente per le proteine strutturali VP4 e VP7, risulta fondamentale alla comprensione dell'epidemiologia virale, con particolare riguardo alla possibile trasmissione interspecie animale-uomo. Nel presente lavoro, è stata condotta un'indagine al fine di valutare la distribuzione e la prevalenza delle diverse combinazioni genotipiche G e P nelle popolazioni bovine presenti sul territorio oggetto di studio.

Il campionamento è stato condotto in allevamenti bovini situati in alcune province dell'Emilia Romagna e Lombardia. Tutti i campioni fecali testati, positivi per *Rotavirus* mediante ELISA, provenivano da vitelli di età non superiore ad un mese, affetti da grave sintomatologia enterica o deceduti per diarrea acuta.

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata con il kit commerciale *RNAeasy mini kit*, e la caratterizzazione molecolare dei genotipi G e P è stata effettuata mediante *reverse transcription-nested polymerase chain reaction* (RT-nPCR). Per un'indagine più dettagliata, regioni specifiche dei geni codificanti per la proteina VP7 sono state sottoposte a sequenziamento nucleotidico.

Le sequenze ottenute sono state successivamente allineate a sequenze rappresentative di ceppi di *Rotavirus* presenti nel *database* NCBI.

La genotipizzazione degli stipti oggetto dello studio ha rivelato la presenza di differenti G e P tipi tra e dentro i diversi allevamenti. La gran parte dei ceppi di *Rotavirus* identificati era costituita dal tipo G6, comunemente diffuso negli allevamenti bovini di tutto il mondo, seguito in percentuale più bassa dal tipo G10. Gli stessi genotipi G sono stati riscontrati in associazione con i tipi P[11] e P[1], rispettivamente. Il confronto dei dati ottenuti con quelli relativi ad un analogo studio condotto in precedenza suggerisce che i ceppi di *Rotavirus* circolanti negli allevamenti bovini dell'Italia settentrionale variano considerevolmente nel tempo.

P58. CARATTERIZZAZIONE DI CORONAVIRUS FELINI ISOLATI IN ITALIA

Barbara Bedini, Emiliana Falcone, Edoardo Vignolo, Marcella Nenci,
Innocenzo Di Pasquale, Livia Di Trani
Istituto Superiore di Sanità, Roma

La famiglia dei *Coronaviridae* comprende virus generalmente associati a sindromi respiratorie ed enteriche dei vertebrati. Ai coronavirus, suddivisi in 5 gruppi antigenici, appartengono i coronavirus dei felini (FCoVs) responsabili di infezioni enteriche subcliniche o di lieve entità e di una rara malattia immuno-mediata, la Peritonite Infettiva Felina (FIP), che rappresenta la più frequente causa di mortalità nei felini. I virus FCo vengono distinti in due differenti sierotipi (FCoV I e FCoV II) in base alla capacità di replicazione *in vitro*, alle correlazioni antigeniche con il coronavirus del cane (CCoV), alla differente reattività sierologica con anticorpi monoclonali specifici verso la proteina Spike (S) e al confronto tra le sequenze nucleotidiche del gene S.

Studi molecolari hanno dimostrato che i FCoVs di tipo II derivano da eventi di ricombinazione genetica tra CCoVs e FCoVs di tipo I; inoltre delezioni in regioni diverse del genoma virale sono responsabili della generazione dei virus FIP.

In questo studio è stata valutata la frequenza e la distribuzione dei due sierotipi di FCoVs in gatti naturalmente infetti, mediante RT-PCR, parziale sequenziamento del gene codificante per la proteina S e analisi filogenetica.

Il test di RT-PCR, eseguito su 120 tamponi fecali di felini clinicamente sani, appartenenti a due gattili, ha consentito l'identificazione di 37 campioni positivi per FCoV; inoltre mediante amplificazione di una porzione specifica del gene S è stato possibile caratterizzare i due sierotipi responsabili dell'infezione negli animali. I risultati ottenuti hanno indicato che appartengono rispettivamente al tipo I e al tipo II l'81% e l'8% dei campioni positivi, mentre l'11% dei campioni presentano la doppia infezione. L'analisi delle sequenze del gene S ha dimostrato una identità nucleotidica che varia dall'84 al 100% tra i ceppi FCoVs I e dal 91 al 100% tra i ceppi FCoVs II; inoltre il confronto con le sequenze presenti in GenBank di FCoVs, ha evidenziato in un campione con doppia infezione l'inserzione di 6 nucleotidi all'estremità 5' del gene. L'analisi filogenetica delle sequenze geniche ha dimostrato un raggruppamento in due differenti cluster dei campioni esaminati, corrispondente alla suddivisione tra FCoVs di tipo I e II dei virus di referenza.

La presente indagine dimostra la diffusione e la prevalenza dei diversi sierotipi FCoVs in Italia; inoltre l'identificazione di doppie infezioni negli animali analizzati suggerisce nuovi elementi di studio al fine di valutare la comparsa di coronavirus felini con caratteristiche molecolari diverse da quelle sinora note.

P59. SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICO-MOLECOLARE DEI ROTAVIRUS ISOLATI DA POPOLAZIONE PEDIATRICA

Maria Chironna (a), Anna Sallustio (a), Cesare Di Bari (b), Salvatore Barbuti (a), Michele Quarto (a)

(a) DIMIMP, Sezione di Igiene, Università degli Studi di Bari

(b) Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, ASL BA4, Bari

L'obiettivo è quello di caratterizzare mediante analisi delle sequenze nucleotidiche e filogenesi i ceppi di *Rotavirus* isolati in corso di gastroenterite acuta in soggetti in età pediatrica in Puglia.

Sono stati collezionati campioni di feci provenienti da pazienti pediatriche affette da gastroenterite acuta e ospedalizzate presso l'Ospedale Giovanni XXIII di Bari nel corso del 2002-2003. Tutti i campioni di feci sono stati testati per virus enteropatogeni mediante tecniche molecolari. In particolare, la ricerca di *Rotavirus* è stata effettuata mediante RT-PCR utilizzando primer nella regione VP7 che amplificano un frammento di 392 paia di basi. Gli ampliconi dei campioni risultati positivi in RT-PCR sono stati purificati e sottoposti a sequenziamento automatico (ABI PRISM 377). Le sequenze sono state analizzate utilizzando il software Autoassembler 2.0. L'analisi filogenetica è stata effettuata mediante Clustal X. Nell'analisi filogenetica sono stati inclusi isolati di riferimento e ceppi caratterizzati nel corso di altri studi.

Dei 34 ceppi di *Rotavirus* isolati da casi di gastroenterite sono stati sequenziati e caratterizzati preliminarmente 10 ceppi. Otto degli isolati caratterizzati clusterizzava con ceppi di riferimento di sierotipo G1 sebbene, nell'ambito dei G1, formavano 4 distinti cluster. Due ceppi, invece, che presentavano un'omologia del 99% tra loro, clusterizzavano con ceppi di riferimento di sierotipo G2, in particolare con un ceppo di *Rotavirus* isolato in Irlanda negli anni 1997-1999.

Studi di prevalenza hanno mostrato che i *Rotavirus* di gruppo A rappresentano il secondo patogeno più frequentemente isolato in corso di gastroenterite acuta in pazienti pediatriche in Puglia. Dall'analisi molecolare dei ceppi finora analizzati emerge un'elevata circolazione di ceppi G1 e la presenza di ceppi G2, in accordo con i correnti dati epidemiologici. La caratterizzazione dei restanti isolati consentirà di verificare l'eventuale presenza di ceppi diversi da G1 e G2 e l'eventuale circolazione di ceppi G9, considerati oggi emergenti anche in Italia.

RICERCA DI PATOGENI VIRALI IN BAMBINI AFFETTI DA GASTROENTERITE ACUTA MEDIANTE TECNICHE MOLECOLARI

Maria Chironna (a), Anna Sallustio (a), Angela M.V. Larocca (a), Cesare Di Bari (b), Michele Quarto (a)

(a) DIMIMP, Sezione di Igiene, Università di Bari

(b) Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, ASL BA4, Bari

L'obiettivo è quello di valutare la prevalenza di virus enteropatogeni in bambini ospedalizzati per gastroenterite acuta mediante tecniche molecolari.

Tra maggio 2002 e giugno 2003 sono stati collezionati campioni di feci provenienti da bambini affetti da gastroenterite acuta ricoverati presso l'Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII di Bari. Per ogni campione sono stati rilevati dalla cartella clinica i dati anagrafici e gli eventuali fattori di rischio. Ciascun campione è stato convertito in estratto fecale al 10% in PBS e congelato a -20°C fino all'esecuzione dei test molecolari. Su ogni campione è stata effettuata la ricerca mediante PCR o RT-PCR/nested PCR, di *Rotavirus*, *Norovirus*, *Adenovirus* e *Astrovirus*.

Sono stati collezionati in totale 478 campioni di feci. Di questi sono stati analizzati preliminarmente i campioni provenienti da 100 bambini: 56 maschi e 44 femmine, con età media 4 anni (range 2-16 anni). Il 77% dei campioni è risultato positivo per almeno un patogeno virale. Di questi, il 65% mostrava positività per *Norovirus*, il 44% per *Rotavirus*, il 16% per *Adenovirus* e l'1% per *Astrovirus*. Inoltre, il 25%, mostrava positività per due patogeni e la maggior parte delle coinfezioni era attribuibile a *Rotavirus* e *Norovirus*. Nei 33 bambini ≤ 3 anni così come nei 51 bambini ≤ 5 anni il principale agente isolato è risultato il *Norovirus*.

In Puglia i principali agenti virali di gastroenterite acuta nei bambini sono rappresentati dai *Norovirus* e dai *Rotavirus*. Diversamente da quanto correntemente riportato, l'agente più frequentemente riscontrato nel campione esaminato è stato *Norovirus* e non *Rotavirus*, anche in bambini ≤ 3 anni d'età. L'analisi di un maggior numero di soggetti consentirà di verificare i risultati finora osservati. L'impiego della diagnostica molecolare per la ricerca dei principali virus enteropatogeni può contribuire al corretto inquadramento sia epidemiologico che terapeutico delle gastroenteriti acute infantili.

DUE CASI DI OPISTORCHIASI UMANA IN UMBRIA

Daniele Crotti (a), Maria Letizia D'Annibale (a), Maria Letizia Fioravanti (b), Andrea Gustinelli (b), Maria Chiara Medori (a), Silvio Pampiglione (b)

(a) Sezione di Microbiologia e Parassitologia Clinica, Ospedale R. Silvestrini, Azienda Ospedaliera di Perugia (b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi di Bologna

Nel luglio 2003 ad un uomo di 42 anni, che accusava febbre con cefalea, nausea, marcata astenia e presenza di ipereosinofilia (14%) fu prescritto anche un esame coproparassitologico. Inizialmente fu diagnosticata una *dientamoebiasi*, per la quale il soggetto venne trattato. Ad un controllo successivo, condotto a settembre, mentre *D. fragilis* non fu più reperita, venne rilevata la presenza di piccole uova opercolate attribuibili al gruppo *Opistorchis/Clonorchis*. Tali uova, anche sulla base delle indicazioni epidemiologiche fornite, vennero identificate come uova di *Opistorchis felineus*, unico trematode del gruppo già segnalato in Italia, seppure in un lontano passato e soltanto in animali (cane, gatto). Tale reperto fu confermato in altri 3 campioni successivi e nel campione iniziale che fu riesaminato dopo suo scongelamento. Uova di *O. felineus* furono individuate anche in 3 campioni fecali della moglie. Ad una attenta anamnesi risultò che entrambi i soggetti avevano consumato nel mese di giugno presso un ristorante locale una porzione di tinca marinata a freddo pescata nel lago Trasimeno. Il pescatore confermò la freschezza del pesce e il ristoratore la provenienza autoctona. La coppia ammise di non avere mai consumato in precedenza pesce d'acqua dolce, di non avere mai mangiato prodotti ittici in ristoranti orientali, di non essere mai stati in paesi a endemia nota per tali parassitosi. Ipotizzando la provenienza autoctona di tale parassita sono state condotte successivamente alcune indagini su varie partite di tinche al fine di rilevare la presenza di metacercarie di tale trematode. In due sole tinche furono individuate rarissime ma fragili metacercarie, che non poterono pertanto essere identificate. Nell'autunno 2003 il primo Autore si sottopose alla ingestione di 4 etti di tinche marinate di analoga provenienza, ma a distanza di 3 mesi ripetute indagini coproparassitologiche diedero esito negativo, così come non comparve un aumento della eosinofilia periferica. Alcuni molluschi gasteropodi raccolti al lago non mostrarono appartenere al genere *Bythinia* (*B. leachi* è ospite comune di *O. felineus*), sebbene nel passato altra specie di *Bythinia* sia in tale lago stata individuata. Molte specie ittiche sono periodicamente immesse nel lago Trasimeno (anche provenienti da aree endemiche per tali trematodi), mentre le tinche hanno qui un loro habitat naturale da tempo. Pur essendo suggestiva la possibile origine autoctona di tale parassitosi, è necessario proseguire le indagini per confermare tale stato di cose.

P60. METODI DIAGNOSTICI NELLO STUDIO DELLE EPIDEMIE DI GASTROENTERITE CAUSATE DA NOROVIRUS

Silvia Crudeli, Marina Monini, Franco Maria Ruggeri
Istituto Superiore di Sanità, Roma

I *Norovirus* sono virus a RNA a singolo filamento che causano epidemie di gastroenterite sia nei bambini che negli adulti. L'infezione viene trasmessa sia per contatto diretto persona-persona, sia attraverso veicoli alimentari, quali frutti di mare e ortaggi, o ambientali, in particolare acque contaminate. Durante le epidemie di gastroenterite in comunità (ospedali, scuole, cliniche a lunga degenza, ristoranti, ecc), il numero dei soggetti colpiti può essere molto elevato, solitamente più del 70% della popolazione a rischio. A causa dell'assenza di metodi di coltura per questi virus, la diagnosi viene effettuata quasi esclusivamente con metodi molecolari, attraverso l'individuazione di sequenze specifiche di RNA genomico virale nei campioni clinici o nelle matrici alimentari o ambientali. In questo studio, sono riportati i risultati delle indagini di laboratorio condotte su alcune epidemie di gastroenterite avvenute in Italia durante gli ultimi tre anni.

I campioni clinici sono stati prelevati da soggetti affetti da gastroenterite (sintomi più frequenti: vomito e diarrea) nel corso di episodi epidemici in comunità. L'RNA virale è stato estratto mediante GTC-silice e sottoposto a retro-trascrizione e successiva amplificazione (*one tube* RT-PCR) di una porzione di 327 bp dell'ORF1 (codificante l'RNA polimerasi virale). Per la conferma della diagnosi e per la caratterizzazione dei genotipi di norovirus ritrovati, sono stati impiegati test di Southern blotting, Reverse line blot hybridization (RLBH) e sequenziamento nucleotidico. Le sequenze genomiche di norovirus ottenute sono state confrontate con sequenze presenti in una specifica banca dati europea (FBVE) per studi di tipo filogenetico.

I metodi diagnostici sviluppati si sono dimostrati efficienti nella rilevazione dei norovirus nei campioni di feci, ma i tempi di raccolta dei campioni, la loro preparazione per l'analisi e conservazione sono risultati essere critici per l'esito della diagnosi virologica. La genotipizzazione dei norovirus analizzati ha evidenziato una notevole eterogeneità genetica tra le diverse epidemie, suggerendo la circolazione di più genotipi virali in Italia. Generalmente, le epidemie sono risultate correlate ad un unico genotipo virale, ma i dati acquisiti suggeriscono che la trasmissione mediata dall'ambiente, in particolare dall'acqua, o dagli alimenti, possa comportare la contemporanea infezione di una popolazione a rischio con più genotipi di *Norovirus*.

P61. RICERCA DI GIARDIA E CRYPTOSPORIDIUM IN PISCINE DELLA CITTÀ DI PALERMO: RISULTATI PRELIMINARI

Maria Antonella Di Benedetto (a), Bruno Marsala (b), Florinda Di Piazza (a),
Giuseppe Franco (a), Rosalaura Oliveri (a)
(a) *Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi di Palermo*
(b) *Servizio di Sanità Pubblica, ASL 6 Palermo*

Epidemie di gastroenterite da *Cryptosporidium* e *Giardia* correlate all'uso di piscine sono state riportate a partire dal 1988 in Regno Unito e USA. La resistenza delle (oo)cisti al cloro e agli stress ambientali e la bassa carica infettante che li caratterizza rende possibile la loro trasmissione durante l'attività ricreazionale.

Obiettivo del nostro studio è valutare la presenza dei due protozoi in piscine della città di Palermo.

Per lo studio sono state selezionate sei piscine a diversa gestione: due di un Parco di divertimenti, una di un hotel vicino il mare, una presso un club sportivo universitario, una del Comune di Palermo e una di una caserma militare.

Giardia e *Cryptosporidium* sono stati ricercati in 20 litri di acqua seguendo le indicazioni dettate da EPA-Method 1623; le indagini batteriologiche (coliformi totali, coliformi fecali, *E. coli*, enterococchi e *P. aeruginosa*) sono state condotte secondo gli Standard Methods.

Sono stati inoltre presi in considerazione i parametri pH, cloro-residuo e torbidità.

Le indagini batteriologiche hanno dato esito negativo in tutti i campioni esaminati; i valori di cloro-residuo sono risultati compresi tra 0,8 e 1,03 ppm e quelli di pH tra 7,0 e 7,3. La torbidità è risultata compresa tra 0,12 e 1,20 NTU.

Giardia è stata rilevata in due piscine (una per adulti e una per bambini) del parco di divertimenti con valori di cisti > 200/l e nella piscina del club universitario con valori di cisti di 0,15/l. *Cryptosporidium* è stato riscontrato solo nelle due piscine del parco di divertimenti con valori di 1 oocisti/l nella vasca per adulti e 2 oocisti/l in quella per bambini.

Questo studio dimostra la presenza di *Giardia* e *Cryptosporidium* in piscine della città di Palermo nonostante il buon profilo igienico rilevato. I dati ottenuti evidenziano l'importanza dell'adozione di adeguate norme comportamentali atte a minimizzare gli incidenti fecali in vasca poiché fattori come un'ottimale costruzione della piscina, buona qualità dell'acqua, idonea filtrazione e disinfezione non sono in grado di scongiurare del tutto il rischio di contaminazione fecale dell'acqua.

P62. RICERCA DI MARCATORI GENETICI PER UN APPROCCIO ALL'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA TRICHINELLOSI

Giuseppe La Rosa, Gianluca Marucci, Edoardo Pozio
Istituto Superiore di Sanità, Roma

I marcatori genetici sono ampiamente usati nello studio della genetica di popolazione animali, ma solo recentemente è stata riconosciuta la loro importanza nello studio dell'epidemiologia delle infezioni parassitarie. La mancanza di marcatori molecolari polimorfici in *Trichinella spiralis*, agente eziologico della trichinellosi umana, ha impedito lo studio della struttura di popolazione e, di conseguenza, molti aspetti della biologia di popolazione ed epidemiologia di questo nematode sono tuttora poco chiari. La conoscenza dei meccanismi di trasmissione dei parassiti tra ospiti selvatici, i livelli di flusso genico tra isolati, l'influenza del ciclo selvatico sul ciclo domestico, è indispensabile per attuare le necessarie strategie di controllo dell'infezione. Il progetto prevede lo studio delle regioni a bassa complessità del genoma di *T. spiralis* per la ricerca di marcatori polimorfici in grado di definire la struttura genetica di popolazione del parassita. Le regioni del genoma a bassa complessità (es. microsatelliti) sono caratterizzate da una bassa specificità locale che occasionalmente provoca la perdita o l'acquisizione di materiale genetico, con conseguente produzione di alleli differenti come peso molecolare e quindi facilmente riconoscibili mediante elettroforesi. Lo screening di circa 1500 sequenze presenti in banca dati (*Trichinella spiralis* EST project) ha permesso di individuare circa 100 regioni a bassa complessità fiancheggiate da coppie di primer idonee alla loro amplificazione PCR. La PCR è stata eseguita utilizzando un pool di individui (1000/10000), questo per co-amplificare in un'unica reazione tutti gli alleli eventualmente presenti nella popolazione. Cinque loci su 100 hanno mostrato la presenza di almeno 2 alleli con diverso peso molecolare. Gli stessi prodotti PCR sono stati sottoposti ad analisi degli eteroduplex per mettere in evidenza alleli varianti per poche basi e non separabili con metodi elettroforetici standard. I risultati hanno mostrato che 7 loci hanno un polimorfismo intra-isolato in almeno un isolato tra i nove studiati. In altri 22 loci è stato poi rilevato un polimorfismo inter-isolato, messo in evidenza mediante analisi eteroduplex di campioni derivati dall'unione dei prodotti PCR dei singoli isolati. Sebbene i risultati siano preliminari, l'isolamento di 34 potenziali marcatori genetici è un promettente punto di partenza per la caratterizzazione genetica degli isolati. Infatti, da una prima analisi della distribuzione degli alleli, viene evidenziata una frammentazione dell'areale di distribuzione di *T. Spiralis* e in particolare l'isolamento riproduttivo degli isolati asiatici rispetto a quelli europei.

P63. ISOLAMENTO DI OOCISTI DI *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* DA VEGETALI CONTAMINATI SPERIMENTALMENTE MEDIANTE “ENVIROCHEK SAMPLING CAPSULE” E SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA

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

Dipartimento di Scienze per la Salute, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Cryptosporidium parvum è attualmente considerato un importante patogeno umano associato al consumo di alimenti, come la frutta e alcuni vegetali, mangiati crudi. Questi possono essere contaminati durante le fasi di produzione, raccolta, distribuzione e consumo. I metodi disponibili per isolare le oocisti sono poco sensibili. In questo studio abbiamo valutato il metodo della filtrazione con *Envirochek Sampling Capsule* (ESC) (Pall, Milano, Italia) e della separazione immunomagnetica (IMS).

Per la contaminazione sperimentale dei vegetali sono state utilizzate feci contenenti oocisti di *Cryptosporidium parvum* fornite dalla *Health Protection Agency* di Londra. La ricerca è stata effettuata su 7 gruppi di campioni di lattuga, ognuno diviso in 5 porzioni da 100g, contaminate ciascuna con 5 diluizioni seriali di materiale fecale. Il numero delle oocisti presenti nella prima diluizione (10-1) è stato stimato mediante colorazione modificata Ziehl-Neelsen (MZN) e conta al microscopio. Ogni porzione contaminata è stata posta in un barattolo di vetro da 2500 mL insieme a 2000 mL di soluzione di lavaggio. I barattoli, chiusi ermeticamente, sono stati agitati per 10 min a 100 rpm. Il lavaggio dei vegetali è stato effettuato 5 volte e dopo ognuno l'eluente è stato raccolto e filtrato mediante ESC. L'eluato, centrifugato a 1000 G per 10-15 min, è stato sottoposto a IMS e MZN.

Il numero di oocisti presenti nelle feci era di 750000/mL. Le oocisti contenute mediamente nella diluizione 10-1 usata per contaminare i vegetali era di 17214/mL. Il numero medio delle oocisti presenti nell'eluato raccolto dopo la filtrazione è stato di 682,8/ml. Dopo l'IMS, il numero medio di oocisti contate al microscopio per ciascuna diluizione è stato di: 10⁻¹: 1121,4; 10⁻²: 41,6; 10⁻³: 7,6; 10⁻⁴: 0,7; 10⁻⁵: 0.

La percentuale di oocisti recuperate mediante la filtrazione con capsula è stata bassa (4,0%). Questo risultato potrebbe essere causato da differenti fattori come ad esempio: lavaggio ed eluizione inefficienti verso quelle oocisti adese alle foglie dei vegetali, oppure probabile formazione di agglomerati all'interno delle capsule, etc. Il numero medio di oocisti recuperate è aumentato dal 4% prima della IMS al 6,5% dopo la IMS, mostrando come l'IMS riesca a facilitare la conta e ad incrementare il recupero delle oocisti. I risultati suggeriscono la necessità di effettuare ulteriori esperimenti per aumentare la sensibilità delle metodiche proposte, anche attraverso l'applicazione di tecniche molecolari come la PCR di sequenze specifiche.

P64. RICERCA DI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS DELL'EPATITE E IN SOGGETTI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI A CONTATTO CON SUINI

Fabio Ostanello (a), Andrea Caprioli (a), Giuseppe Malenchini (b), Giuliano Furlini (c)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna;* (b) *Servizio di Sicurezza, Igiene e Medicina del Lavoro, Università di Bologna;*
(c) *Unità Operativa di Microbiologia, Policlinico S. Orsola, Bologna*

Il virus dell'epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV) è una causa frequente di epatite acuta nei paesi in via di sviluppo dove l'infezione viene trasmessa principalmente per via oro-fecale. Virus HEV-like sono stati identificati in diverse specie animali e in particolare in quella suina. Negli ultimi anni, casi sporadici di malattia sono stati descritti anche in numerosi paesi industrializzati, compresa l'Italia, in persone senza un'anamnesi di viaggi in zone considerate endemiche. L'analisi nucleotidica dei virus associati a questi casi ha mostrato un elevato grado di omologia con ceppi di HEV isolati da suini e cinghiali, facendo ipotizzare un'origine zoonosica di tali infezioni. Studi sperimentali hanno inoltre dimostrato la possibilità di trasmissione interspecifica di ceppi umani al suino e di ceppi suini a primati non umani. Per tali motivi, la malattia è oggi considerata una zoonosi emergente. Alcune indagini condotte in USA, Grecia, Taiwan e Moldova hanno evidenziato un'elevata prevalenza anticorpale anti-HEV in soggetti che lavorano a contatto con suini. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di determinare, nel nostro Paese, la prevalenza di anticorpi anti-HEV in un gruppo di soggetti professionalmente esposti al contatto con suini. Durante il meeting della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini (SIPAS, 2004), sono stati effettuati prelievi ematici da 84 soggetti. Le caratteristiche del campione erano le seguenti: età media: 41 anni; n. medio di anni di contatto professionale: 15; n° medio di ore/settimana di contatto: 20; n. medio di allevamenti visitati/settimana: 9. I campioni sono stati saggiati per la presenza di IgG anti-HEV utilizzando un test ELISA commerciale. Nessuno dei sieri esaminati è risultato positivo. In Italia, nella popolazione umana, la prevalenza anticorpale per HEV è di circa l'1-5%, mentre non sono attualmente disponibili informazioni relativamente alla circolazione del virus nella popolazione suina. Studi condotti in altri Paesi hanno evidenziato un incremento significativo del rischio d'infezione per HEV in soggetti che hanno contatti professionali con suini rispetto a popolazioni di controllo. Il risultato contrastante da noi ottenuto potrebbe essere dovuto ai seguenti fattori: 1) la prevalenza nella specie suina in Italia è notevolmente inferiore rispetto a quella rilevata in altri Paesi, riducendo così le probabilità per gli addetti di contrarre l'infezione con ceppi suini; 2) in Italia, il virus che circola nella popolazione suina è scarsamente infettante per l'uomo; 3) il test ELISA utilizzato non era sufficientemente sensibile.

CARATTERIZZAZIONE DI NOROVIRUS IN CAMPIONI DI MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI PROVENIENTI DAL NORD ADRIATICO

Enrico Pavoni (a), Francesca Fallacara (a), Luciana Croci (b), Elisabetta Suffredini (b), Dario De Medici (b), Silvia Rubini (c), Giuseppe Arcangeli (d), Marina Nadia Losio (a), Paolo Boni (a)

a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia; b) Istituto Superiore di Sanità, Roma; c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Ferrara; d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Adria (RO)

I *Norovirus*, o *Norwalk-Like Virus* (NLV), appartengono alla famiglia dei *Caliciviridae* e sono riconosciuti come la principale causa di infezioni gastroenteriche acute non batteriche nell'uomo. Essi sono altamente infettanti e si trasmettono tramite l'ingestione di alimenti contaminati (soprattutto molluschi, vegetali e acqua) oppure da persona a persona con modalità oro-fecale, in particolar modo negli ambienti densamente popolati. Per queste caratteristiche costituiscono una problematica sanitaria in continua espansione e sono considerati come patogeni emergenti poiché non contemplati nelle direttive nazionali ed europee. L'impossibilità di una propagazione in coltura cellulare ha sempre costituito un ostacolo al loro studio, ma negli ultimi anni sono stati fatti progressi significativi grazie al sequenziamento del genoma. I NLV contengono una molecola di ssRNA positivo di circa di 7,5-kb, che comprende tre regioni codificanti: ORF1 (poliproteina precursore di numerose proteine non strutturali, tra cui la RNA Polimerasi-RNA dipendente), ORF2 (proteine del capsido), ORF3 (proteina minore dalla funzione ignota). Precedenti studi, utilizzando reazioni di RT-PCR con primer specifici per ORF1 e ORF2, hanno permesso di effettuare analisi filogenetiche e di raggruppare i NLV in due diversi genogruppi (GGI e GGII) comprendenti rispettivamente 9 (GGI) e 10 (GGII) genotipi. Considerando i molluschi eduli lamellibranchi fra i principali veicoli di trasmissione all'uomo, in virtù della loro attività di filtrazione e di accumulo dei patogeni, è stato effettuato uno studio con l'obiettivo di individuare la presenza di *Norovirus* in campioni destinati al consumo e di caratterizzarne l'appartenenza ai diversi genotipi. In un periodo di tempo compreso fra giugno 2003 e giugno 2004, sono stati analizzati 237 molluschi comprendenti *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes philippinarum* e *Crassostrea* spp. raccolti in diverse aree del mare Adriatico settentrionale. Essi sono stati sottoposti ad RT-booster-PCR utilizzando primer specifici per la RNA Polimerasi precedentemente descritti. La conferma dei campioni positivi è stata fatta mediante ibridizzazione con Southern Blot. I prodotti di PCR sono stati sequenziati e analizzati tramite sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Genetic Analyser. L'assemblaggio delle sequenze, il loro allineamento e le analisi filogenetiche sono stati effettuati col software DNASTAR's Lasergene, mentre la caratterizzazione del genotipo di appartenenza mediante confronto delle sequenze in uno specifico database. Su 36 campioni positivi (15,2%), 31 sono stati sottoposti a sequenziamento ed è risultato che tutti appartenevano al GGII; in particolare, 10 al genogruppo Melksham, 12 ad Hawaii, mentre 7 al GGIIb, attualmente il più diffuso in Europa. Due campioni sono stati rispettivamente caratterizzati come Lordsdale e Amsterdam.

CYCLOSPORA CAYETANENSIS: UNA ZONOSI D'IMPORTAZIONE. PICCOLO OUTBREAK IN TURISTI ITALIANI NEL 2003

Annibale Raglio, Marco Passera, Graziano Bargiggia, Anna Ghilardi, Antonio Goglio
UO Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti Bergamo

Cyclospora cayetanensis, protozoo coccidio ad elettiva localizzazione intestinale, è riconosciuto dal 1977 come nuovo agente eziologico di enteriti diarroiche sia in soggetti normoergici che ipoergici. Le elevate prevalenze riscontrate in ambito tropicale le riconoscono un ruolo emergente come causa di diarrea del viaggiatore o associata al consumo di alimenti contaminati importati. Riportiamo il caso di un gruppo di 8 turisti italiani tutti sintomatici ma dove la diagnosi è stata posta solo in 2 pazienti.

Donna di 32 ani e maschio di 33 anni, italiani, coniugi, hanno effettuato un viaggio di 28 giorni in Perù nell'agosto 2003. Quasi a metà della loro vacanza non trovando altri alimenti e suggestionati dalla "qualità" di presentazione, hanno mangiato panini con pomodoro e insalata e macedonia di frutta abbandonando le norme igieniche che gli erano state consigliate e che avevano adottato durante i primi giorni del viaggio. Dopo 10 giorni, quasi al termine della vacanza, hanno presentato numerose scariche diarroiche, dolori addominali, vomito, inappetenza e astenia. Rientrati in Italia 8 giorni dopo l'inizio della sintomatologia, presentavano ancora diarrea, la donna lamentava anche diffuso meteorismo e dolore epigastrico irradiato all'ipocondrio destro. Coproculture batteriche seriate risultavano negative, mentre un esame parassitologico delle feci evidenziava la presenza di numerose oocisti immature e morulate di *C. cayetanensis*.

I pazienti sono stati sottoposti a trattamento specifico con cotrimossazolo. Il quadro coproparassitologico si è negativizzato 3 giorni dopo il termine della terapia.

I due pazienti hanno riferito che altri 6 compagni di viaggio di altra città italiana hanno mangiato gli stessi alimenti e presentato gli stessi sintomi. Nessuno di loro si è sottoposto ad esami microbiologici; i sintomi si sono risolti dopo trattamento con cotrimossazolo

Gli esami colturali e parassitologici delle feci sono stati eseguiti secondo le linee guida dell'OMS e sono stati routinariamente esaminati tre campioni.

Il caso descritto ci induce a sottolineare che, come già riportato nella letteratura internazionale, *C. cayetanensis* deve essere indagata quale ulteriore, potenziale causa di diarrea nel viaggiatore internazionale. Pertanto tutti i laboratori devono essere in grado di applicare corrette procedure diagnostiche e devono aggiornare le loro conoscenze teoriche e pratiche anche in riferimento a patogeni rari od emergenti. Una corretta diagnosi delle diarree del viaggiatore ha una rilevanza epidemiologica consentendo l'identificazione e il controllo delle strutture di ristorazione a rischio. Si sottolinea inoltre l'importanza di raccomandare sempre ai viaggiatori di attenersi scrupolosamente all'applicazione delle norme igienico-alimentari.

P65. RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE A IN MOLLUSCHI BIVALVI: LA RT-PCR IN FASE SINGOLA MOSTRA UN'ELEVATA SENSIBILITÀ

Maria Vitale (a), Anna Maria Di Noto (a), Antonella Costa (a), Fabrizio Vitale (a),
Giusy Galioto (a), Nadia Losio (b), Santo Caracappa (a)

(a) IZS della Sicilia "A. Mirri" Palermo

(b) IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

I molluschi bivalvi hanno un ruolo non indifferente nella trasmissione di alcune patologie umane a causa di fattori legati alle loro modalità di nutrizione, (filtrazione) da un lato, e ad alcune diffuse consuetudini nel consumo di tali prodotti a crudo dall'altro. Attraverso i liquami arrivano al mare non soltanto batteri noti (*Shigella*, *Salmonella*), ma anche particelle virali. I virus enterici vengono eliminati dagli individui infetti attraverso le feci, arrivano nelle acque fognarie e dal momento che alcune specie possono resistere ai normali trattamenti di depurazione e disinfezione, provocano la contaminazione delle acque marine. Nei bivalvi le particelle virali si concentrano attraverso la filtrazione, da cui il rischio per l'uomo di ingestione di virus attivi attraverso il consumo alimentare. L'analisi microbiologica su campioni di molluschi bivalvi provenienti da allevamenti, da pescherie o da centri di depurazione, fa parte della normale attività dei laboratori di microbiologia degli alimenti all'interno della rete degli IZS sparsi sul territorio italiano. Le metodiche microbiologiche per la ricerca di Coliformi fecali, *E. coli* e *Salmonella* sono alquanto standardizzate all'interno dei vari laboratori che lavorano secondo elevati standard di qualità; diverse sono le problematiche connesse alla ricerca di alcune specie di enterovirus e del virus dell'epatite, per i quali le metodiche basate sulla PCR sono al momento le più attendibili.

È stata messa a punto una metodica per la rilevazione del virus dell'epatite A mediante nested PCR utilizzando una reazione di trascrizione inversa e prima PCR in fase singola invece delle 2 fasi separate. 10 µL da questa reazione vengono poi amplificati nella successiva PCR.

Con tale metodica una preparazione del virus dell'epatite A dal titolo di TCID₅₀ = 10^{7,24} / 0,1 mL ha mostrato segnale positivo sino alla diluizione di 10⁷.

In una prima serie di 10 campioni di molluschi bivalvi congelati si è riscontrato 1 positivo per epatite A in un campione di una partita di vongole provenienti da un centro di purificazione in fase di pre-purificazione; il campione della stessa partita dopo la purificazione risulta negativo.

La possibilità di rendere le metodiche molecolari sempre più sensibili mantenendone la specificità è auspicabile soprattutto per gli agenti virali per i quali l'isolamento risulta particolarmente difficile se non impossibile in alcuni casi o richiede comunque abbastanza tempo. Considerando l'elevata resistenza all'ambiente esterno di alcuni enterovirus e del virus dell'epatite A in particolare, una metodica molecolare altamente sensibile può essere un valido aiuto per il controllo alimentare sui molluschi bivalvi.

P66. INDAGINE SULL'INTEGRAZIONE TRA COLTURE CELLULARI E PCR PER IL RILEVAMENTO DI VIRUS ENTERICI

Roberta Zoni (a), Laura Bigliardi (a), Cristina Bacci (b), Giuliano Sansebastiano (a)
(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Igiene Università di Parma*
(b) *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione Alimenti Origine Animale, Università di Parma*

L'utilizzo combinato delle colture cellulari e della PCR con *primer* specifici per la ricerca di virus in campioni ambientali e negli alimenti può portare, come riportato in recenti studi (1, 2), ad un aumento della sensibilità della reazione di PCR e ad una riduzione dei tempi necessari per il rilevamento del virus.

Proprio in quest'ottica abbiamo iniziato prove sperimentali con alcuni virus per determinare la minima concentrazione virale rilevabile con metodica PCR e confrontare la positività a tale reazione con la positività in coltura cellulare integrando le due metodiche.

In queste prime prove è stato saggiato il virus Polio 1, stipite vaccinale, fatto crescere in colture cellulari di rene di scimmia (RC 37).

Diluizioni scalari di tale sospensione sono state saggiate con PCR per verificare la più alta diluizione rilevabile.

Con la concentrazione virale di un log più bassa della minima rilevabile, con la metodica di cui sopra, sono stati effettuati test integrati colture cellulari/PCR.

I primi risultati ottenuti hanno messo in evidenza una buona corrispondenza tra colture e PCR con positività con quest'ultima fino a 10⁻⁶.

L'amplificazione in coltura cellulare nelle prove *Integrated Cell Culture-PCR* (ICC/PCR) ha confermato la riduzione dei falsi negativi e una positivizzazione in tempi più brevi di almeno 24 ore.

Il lavoro prosegue su altri Enterovirus e sul virus A dell'epatite che, come è ben noto, presenta tempi di replicazione in coltura decisamente lunghi.

INDICE DEGLI AUTORI

Acocella Fabio; 41
Addante Nicoletta; 55; 78
Agrimi Umberto; 9
Alborali Giovanni Loris; 42
Alfano Domenico; 47
Alliata Elisabetta; 81
Ammendola Serena; 56; 57; 77
Andreoni Stefano; 22
Antonucci Giovanni; 40
Arcangeli Giuseppe; 104
Arena Sergio; 3; 25; 28; 62
Argentieri Marta; 25
Arista Serenella; 93
Aureli Paolo; 11
Bacci Cristina; 107
Bagnato Barbara; 25
Barbaro Antonio; 24
Barbuti Salvatore; 96
Barco Lisa; 30
Bargiggia Graziano; 105
Baron Thierry; 44
Battista Patrizia; 94
Battisti Antonio; 19; 65; 73
Battistoni Andrea; 56; 57; 77
Bedini Barbara; 95
Bella Antonino; 3
Bellino Mariarosa; 39
Benedetti Ildo; 3; 25; 70
Benedetto RosaMaria; 29
Berducci Giovanni; 56
Bertini Alessia; 58
Bessegato Alida; 21; 27; 30
Bianchi Daniela Manila; 43
Bianchi Silvia; 12
Biavasco Francesca; 10
Bigliardi Laura; 107
Bilei Stefano; 4; 19; 23; 35; 77
Blasi Giuliana; 51
Boccia Antonio; 61
Boccia Delia; 87
Bonardi Silvia; 36
Boni Paolo; 59; 104
Bonora Maria Grazia; 10
Borroni Renata; 41; 44
Bossi Lionello; 57
Bottero Maria Teresa; 43
Bozzetta Elena; 76
Bregoli Marco; 39
Brigotti Maurizio; 7
Brindani Franco; 36
Brizioli Nazzareno Renzo; 41
Bruce Moira; 44
Buccella Carmela; 19; 73
Bucchini Luca; 37
Busani Luca; 3; 5; 6; 28; 65
Cacciò Simone Mario; 13
Calabria Mariarosaria; 64
Calciolo Daniela; 41
Cantoni Carlo; 60
Caprioli Alfredo; 7; 21; 28; 47; 66; 88
Caprioli Andrea; 103
Capuano Federico; 89
Caracappa Santo; 106
Caramelli Maria; 76
Carattoli Alessandra; 58; 70
Carli Agostino; 74
Caroli Daniela; 20
Cartoni Claudia; 44
Carullo Maria Rosaria; 4
Catalano Adolfo; 76
Cavallero Annalisa; 10
Cawthorne Amy; 25
Ceci Giovanna; 84
Celano Gaetano V.; 55
Cenci Telemaco; 85
Cerci Tamara; 73
Ceruti Raffaella; 38
Chiappini Barbara; 40
Chiaretto Giuseppina; 30
Chiavacci Laura; 24
Chiesa Edoardo; 21
Chironna Maria; 68; 96; 97
Ciabatti Ilaria; 23
Cibin Veronica; 30
Cibotti Silvia; 85
Cirillo Giuseppe; 20
Civera Tiziana; 43
Colomba Claudia; 93
Conedera Gabriella; 21; 39; 47
Conigliaro Ludovico; 72
Conte Michela; 40
Cordaro Gessica; 73
Corrò Michela; 66
Coscia Maria Francesca; 84

Costa Antonella; 106
 Crespi Ilaria; 22; 24
 Croci Luciana; 62; 104
 Crotti Daniele; 98
 Crudeli Silvia; 99
 Cucco Lucilla; 51
 Cuomo Alessandra; 64
 D'Agostino Claudia; 41
 D'Aloja Donatella; 55
 D'Annibale Maria Letizia; 98
 Dal Vecchio Anna; 42
 Dalmaso Alessandra; 49
 Dambrosio Angela; 78; 82
 Daminelli Paolo; 59
 Daziano Maria Rosa; 49
 De Castelli Lucia; 4
 De Cesare Alessandra; 60
 De Giusti Maria; 61
 De Grazia Simona; 93
 De Grossi Luigi; 41
 De Luca Antonio; 29
 De Medici Dario; 62; 104
 De Santis Paola; 23
 De Socio Rita; 29
 De Vito Danila; 84
 Decastelli Lucia; 24; 43; 49; 76
 Decurtis Pina; 51
 Defabiani Ivana; 48
 Del Grosso Maria; 87
 Delibato Elisabetta; 62
 Demarco Fabiana; 66
 Di Bari Cesare; 68; 96; 97
 Di Bari Michele Angelo; 40; 44
 Di Bartolo Ilaria; 94
 Di Benedetto Maria Antonella; 100
 Di Egidio Alessandra; 73
 Di Giampietro Gina; 19; 35; 77
 Di Giannatale Elisabetta; 4; 63; 65
 Di Matteo Paola; 73
 Di Modugno Girolamo; 79
 Di Noto Anna Maria; 72; 106
 Di Pardo Luciana; 29
 Di Pasquale Innocenzo; 95
 Di Pasquale Simona; 62
 Di Piazza Florinda; 100
 Di Trani Livia; 95
 Dionisi Anna Maria; 3; 25; 26; 35; 70
 Dipineto Ludovico; 64
 dos Prazeres Rodrigues Dalia; 67
 Epifani Susi; 84
 Esposito Elena; 40; 44
 Faita Roberto; 59
 Falbo Vincenzo; 58
 Falcone Emiliana; 94; 95
 Fallacara Francesca; 104
 Fanelli Incoronata; 45; 69; 83; 102
 Fenizia Domenico; 89
 Ferillo Giovanni; 29
 Ferioli Marcello; 48
 Ferrari Angelo; 76
 Ferrari Giancarlo; 65
 Ferrato Pietro; 48
 Ferrazzi Viviana; 38; 46; 50
 Ferrini Rita; 26
 Figueroa-Bossi Nara; 57
 Filetici Emma; 3; 25; 26; 35; 62
 Filippini Giovanni; 70
 Finazzi Guido; 59
 Fioravanti Alessandro; 21; 73
 Fioravanti Maria Letizia; 98
 Fioretti Alessandro; 64
 Fisichella Stefano; 31; 86
 Foni Emanuela; 36
 Fontana Gabriele; 5
 Fontana Roberta; 10
 Fortina Giacomo; 22
 Fossati Laura; 10
 Franciosa Giovanna; 11
 Franco Alessia; 19; 65; 73
 Franco Giuseppe; 100
 Frassanito Paolo; 40; 44
 Furlini Giuliano; 103
 Gai Francesca; 76
 Galetta Pasquale; 3; 25
 Galiero Giorgio; 47
 Galioto Giusy; 106
 Gallazzi Daniele; 38; 46; 50; 80
 Gallina Silvia; 24
 Gavazza Antonio; 94
 Gavazzi Luigi; 38
 Genghi Luigi; 26
 Gentili Alessandra; 66
 Germinario G. Livio; 82
 Ghilardi Anna; 105
 Giaccone Valerio; 48; 67
 Giacomucci Domenica; 90
 Giammanco Giovanni M.; 71; 93
 Gianfranceschi Monica Virginia; 11
 Giordani Francesco; 41
 Gironacci Luciana; 51
 Gobbini Sonia; 59
 Goffredo Elisa; 4

Goglio Antonio; 105
 Gradassi Sandra; 35
 Gramegna Maria; 5
 Grandesso Stefano; 21; 27; 30
 Grassi Maria Ausilia; 49
 Grasso Guido Maria; 45; 102
 Grattarola Carla; 76
 Graziani Caterina; 3; 6; 28; 65
 Grilli Guido; 38; 46; 50; 80
 Guida Ivana; 72
 Gustinelli Andrea; 98
 Hopki Katie; 58
 Iammarino Flavio; 29
 Ibañez Vela Sandra; 90
 Iob Luciano; 39
 Kroumova Vesselina; 22; 24
 La Rosa Giuseppe; 101
 Lafisca Andrea; 67
 Lana Susanna; 3; 25
 Lanzilotta Salvatore G.; 78; 79
 Larocca Angela M.V.; 68; 97
 Leone Annalisa; 69; 102
 Ligios Ciriaco; 44
 Lo Faro Monica; 76
 Loffredo Rosaria; 25
 Lombardo Dorotea; 75
 Lomonaco Sara; 43
 Losio Marina Nadia; 59; 104
 Losio Nadia; 106
 Lovari Sarah; 73
 Luzzi Ida; 3; 6; 23; 25; 26; 28; 31; 69; 70; 83;
 85
 Macchi Luigi; 5
 Macri Agostino; 66
 Magistrali Chiara; 51; 70
 Malenchini Giuseppe; 103
 Mamma Caterina; 42; 71; 72
 Mancin Marzia; 4; 30
 Mancini Grazia; 29
 Manfreda Gerardo; 60
 Manganaro Federica; 31
 Manso Esther; 10
 Manuppella Annamaria; 20; 29
 Marangon Stefano; 8
 Marcon Stefano; 41; 44
 Marone Piero; 10
 Marrocco Maria Grazia; 19; 35
 Marsala Bruno; 100
 Martella Vito; 93
 Martorana Morena; 43
 Marucci Gianluca; 101
 Marziano Maria Luisa; 7
 Mascilongo Carmela; 29
 Masi Elisa; 75
 Massari Marco; 25
 Mattiazzi Evio; 21
 Medori Maria Chiara; 98
 Melloni Antonella; 29
 Menna Lucia Francesca; 64
 Meo Renato; 29
 Mercati Giuseppe; 20
 Merialdi Giuseppe; 65
 Miccolupo Angela; 79
 Miggiano Chiara; 80
 Minelli Fabio; 7
 Minorello Claudio; 4
 Miotti Scapin Riccardo; 48
 Molina Marina; 20
 Molinari Gian Lorenzo; 22
 Mollichelli Annalisa; 29
 Monastero Paola; 59
 Monini Marina; 94; 99
 Montagna Cosimo O.; 55; 79
 Morabito Stefano; 36; 39; 66; 73; 88
 Morelli Luisella; 40
 Moroder Ludwig; 20; 74; 75
 Mottola Attilio; 27; 30
 Napoli Pierangela; 25
 Nappi Raffaella; 76
 Nastasi Antonino; 42; 71; 72
 Nenci Marcella; 95
 Nonno Romolo; 40; 41; 44
 Normanno Giovanni; 78; 82
 Oliveri Rosalaura; 100
 Onorati Cinzia; 19; 73
 Ostanello Fabio; 103
 Ottaviano Roberta; 29
 Owczarek Slawomir; 3; 28; 70
 Pacello Francesca; 57; 77
 Paglionico Natalia; 55
 Palazzini Nadia; 41
 Palermo Rosanna; 29
 Pampiglione Silvio; 98
 Paniccià Marta; 51
 Pannunzio Pietro; 29
 Panteghini Cristina; 59
 Pantosti Annalisa; 87
 Paolone Luigi; 29
 Parisi Antonio; 55; 78; 79; 82
 Parisi Consiglia; 40
 Pasolli Claudio; 39
 Pasquali Paolo; 56; 57

Passera Marco; 105
 Paterlini Franco; 65
 Pavan Anna; 5
 Pavoni Enrico; 104
 Pendenza Alessio; 25
 Pepe Carla; 29
 Pezzotti Giovanni; 51; 70
 Piccoli Alberto; 25
 Pifferi Annarita; 41
 Pilla Maria Teresa; 5
 Piraino Chiara; 4
 Pisoni Anna Maria; 50; 80
 Pontello Mirella; 5; 42; 81
 Portanova Anna; 25
 Pozio Edoardo; 101
 Prencipe Vincenza; 63
 Procaccino Maria Antonietta; 7
 Quaglia Nicoletta; 79
 Quaglia Nicoletta Cristiana; 82
 Quarto Michele; 68; 96; 97
 Raglio Annibale; 105
 Ranieri Marta; 20
 Ricci Antonia; 4; 6; 8; 28; 30; 35; 65; 66
 Ripabelli Giancarlo; 45; 69; 83; 102
 Rizzi Donatella; 84
 Rizzo Caterina; 84
 Rizzoni Gianfranco; 7
 Romanò Luisa; 12
 Rosone Francesca; 41
 Rossi Mirko; 65; 90
 Rotilio Giuseppe; 56; 57; 77
 Rubini Silvia; 104
 Ruggeri Franco Maria; 94; 99
 Russo Francesca; 21
 Saccardin Cristina; 30
 Salinetti Anna Paola; 19; 23; 35; 77
 Sallustio Anna; 96; 97
 Salmaso Stefania; 3; 25
 Sammarco Michela Lucia; 45; 69; 83; 102
 Sanguinetti Valeria; 65; 90
 Sansebastiano Giuliano; 107
 Santarelli Elettra; 25
 Scalfaro Concetta; 3; 26
 Scarpetta Claudia; 64
 Scavia Gaia; 7
 Scorzato Ivano; 21
 Scuota Stefania; 4; 70; 85
 Scutellà Massimiliano; 29
 Sensale Mariangela; 64
 Serra Roberto; 76
 Simpraga Borka; 66
 Simson Shimon; 40; 44
 Soares Pereira Cristiane; 67
 Sorbara Luigi; 73
 Sperandii Anna Franca; 63
 Spisani Matteo; 59
 Staffolani Monica; 4; 31; 86
 Stampone Lucia; 87
 Stefanelli Simonetta; 35
 Stella Simone; 60
 Stenico Alberta; 75
 Stepan Erminia; 10
 Suffredini Elisabetta; 104
 Tagliabue Silvia; 4
 Terracciano Giuliana; 35
 Threlfall John E.; 58
 Tilola Michela; 59
 Tolli Rita; 19; 23; 35
 Tonelli Alfreda; 63
 Topi Antonietta; 63
 Torosantucci Lorenzo; 45
 Torti Francesca; 29
 Toti Laura; 62
 Tozzi Alberto E.; 7; 25
 Tozzoli Rosagela; 88
 Tozzoli Rosangela; 39
 Trinito Massimo O.; 25
 Trinti Federica; 61
 Tufi Daniela; 61
 Ulissi Maria Agnese; 5
 Vaccari Gabriele; 40; 41; 44
 Vai Loretta; 26
 Valenti Piera; 57
 Vercellotti Lorenzo; 48
 Vidili Antonio; 4
 Vignolo Edoardo; 95
 Villa Laura; 58
 Viniero Arcangela; 68
 Vio Denis; 4; 28; 65
 Viscardi Maurizio; 89
 Vitale Celano Gaetano; 82
 Vitale Fabrizio; 106
 Vitale Maria; 106
 Zanardini Nadia; 59
 Zanetti Alessandro; 12
 Zanon Renato Giulio; 65; 90
 Zicavo Alessia; 85
 Zoni Roberta; 107
 Zotti Bruno; 78

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

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

Roma, settembre 2004 (n. 3) 10° Suppl.