

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

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

**Infezioni trasmesse da alimenti e acqua:  
diagnostica ed epidemiologia**

Regione Lazio  
Roma, 4-5 novembre 2009

**RIASSUNTI**

A cura di  
Ida Luzzi (a), Alfredo Caprioli (b), Gaia Scavia (b), Stefano Bilei (c),  
Antonia Ricci (d), Caterina Graziani (b) e Susan Babsa (b)

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

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

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

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

ISSN 0393-5620  
**ISTISAN Congressi**  
**09/C10**

Istituto Superiore di Sanità

**VII Workshop Nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche. Le infezioni trasmesse da alimenti e acqua: diagnostica ed epidemiologia. Regione Lazio. Roma, 4-5 Novembre 2009. Riassunti.**

A cura di Ida Luzzi, Alfredo Caprioli, Gaia Scavia, Stefano Bilei, Antonia Ricci, Caterina Graziani e Susan Babsa

2009, v, 79 p. ISTISAN Congressi 09/C10

Enter-net è una rete europea per la sorveglianza delle infezioni enteriche, che è stata inserita nel sistema di monitoraggio delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua coordinato dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC). La rete ha i seguenti obiettivi: armonizzare i metodi di tipizzazione, mantenere database aggiornati, identificare e controllare gli episodi epidemici a carattere transnazionale. L'Italia è rappresentata nella rete dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che coordina un sistema di sorveglianza costituito da laboratori del Servizio Sanitario Nazionale operanti nei settori umano, veterinario e ambientale. A partire dal 2001, le attività di Enter-net Italia vengono presentate nel corso di un workshop che nel 2009 ha la veste di un convegno sulla sorveglianza e controllo delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua. Gli obiettivi sono: i) presentare la nuova rete europea di sorveglianza; ii) presentare le attività di Enter-net Italia; iii) analizzare e discutere i sistemi di allerta e le strategie di controllo di queste infezioni.

*Parole chiave:* Microbiologia, Epidemiologia, Zoonosi

Istituto Superiore di Sanità

**VII National Workshop Enter-net Italia. Surveillance system of enteric infections. Foodborne and waterborne diseases: diagnostic and epidemiology aspects. Regione Lazio. Rome, November 4-5, 2009. Abstract Book.**

Edited by Ida Luzzi, Alfredo Caprioli, Gaia Scavia, Stefano Bilei, Antonia Ricci, Caterina Graziani and Susan Babsa

2009, v, 79 p. ISTISAN Congressi 09/C10 (in Italian and in English)

Enter-net is an international network for the surveillance of human enteric infections: recently, it has been included in the surveillance system for foodborne and waterborne diseases coordinated by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The main objectives are the harmonisation of typing methods, the establishment of a regularly updated international database, the recognition and investigation of outbreaks involving different countries. The Istituto Superiore di Sanità (ISS) represents Italy in the network and coordinates a national surveillance system (Enter-net Italia) that involves laboratories operating in the medical, veterinary, and environmental fields. Starting from 2001, Enter-net Italia activities are presented in an annual workshop with the participation of physicians, biologists, veterinarians and technicians operating in the public health services. This year, the workshop is structured as a meeting that, beside presenting Enter-net activities, will provide an update on the epidemiology of foodborne and waterborne diseases.

*Key words:* Microbiology, Epidemiology, Zoonoses

Per informazioni su questo documento scrivere a: [ida.luzzi@iss.it](mailto:ida.luzzi@iss.it), [alfredo.caprioli@iss.it](mailto:alfredo.caprioli@iss.it)

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

---

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

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

© 2009 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

## INDICE

<b>Programma</b> .....	iii
<b>Note per la consultazione</b> .....	v
<b>Relazioni</b> .....	1
<b>Comunicazioni orali e Poster</b> .....	15
<b>Indice degli autori</b> .....	77



## PROGRAMMA

### Mercoledì 4 novembre 2009

12.00 Registrazione dei partecipanti

13.00 Buffet di benvenuto

14.00 Indirizzo di benvenuto

#### Prima sessione

#### **SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI TRASMESSE DA ALIMENTI E ACQUA IN EUROPA**

14.15 *Sorveglianza delle zoonosi trasmesse da alimenti:  
la strategia della Commissione Europea*  
**Giovanni Rezza**

14.35 *Sicurezza alimentare: la rete europea dei Laboratori di Riferimento*  
**Alfredo Caprioli**

14.55 *Sicurezza alimentare: i sistemi internazionali di allerta*  
**Hilde Kruse**

#### Seconda sessione

#### **SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI TRASMESSE DA ALIMENTI E ACQUA IN ITALIA**

15.15 *Enter-net - Sorveglianza delle infezioni da patogeni enterici:  
nuova struttura e attività 2007-2008*  
**Ida Luzzi**

15.35 *Le salmonellosi in ambito veterinario*  
**Antonia Ricci**

15.55 *Salmonella e ambiente: dati 2007-2008*  
**Giuseppe Cirillo**

16.15 Intervallo e visione poster

16.40 Comunicazioni orali

**Giovedì 5 novembre 2009**

**Terza sessione**  
**SISTEMI REGIONALI PER LA SORVEGLIANZA**  
**DELLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI**

- 8.45 *Il sistema di sorveglianza nella Regione Lombardia*  
**Anna Pavan**
- 9.15 *La sorveglianza delle tossinfezioni alimentari in Piemonte*  
**Renata Magliola**
- 9.40 Comunicazioni orali
- 10.15 Intervallo e visione poster

**Quarta sessione**  
**TOSSINFEZIONI ALIMENTARI: PROBLEMATICHE EMERGENTI**

- 11.00 *L'impegno della rete degli IZZSS nel programma nazionale di controllo dei vegetali*  
**Paolo Boni**
- 11.15 *Infezioni da Salmonella e alimenti di origine vegetale*  
**Maria De Giusti**
- 11.30 *Le infezioni da Norovirus in Italia*  
**Franco Maria Ruggeri**
- 11.45 Comunicazioni orali
- 13.00 Intervallo e visione poster
- 14.00 *Infezioni da E. coli O157 e latte crudo*  
**Gaia Scavia**
- 14.20 Comunicazioni orali
- 15.30 Premiazione contributi scientifici e chiusura dei lavori

## NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente lavoro raccoglie le relazioni, le comunicazioni e i poster presentati al workshop. I lavori sono divisi in due sezioni:

- **Relazioni.** Contiene le relazioni secondo l'ordine previsto nel programma.
- **Comunicazioni e Poster.** Le comunicazioni sono presentate 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**



## **SORVEGLIANZA DELLE ZONOSI TRASMESSE DA ALIMENTI: LA STRATEGIA DELLA COMMISSIONE EUROPEA**

Giovanni Rezza

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

La normativa sul controllo delle zoonosi, in particolare quelle trasmesse da alimenti, è andata incontro negli ultimi anni a importanti evoluzioni, a partire dal Libro Bianco e dal Regolamento 178/2002 fino alla recente emanazione della Direttiva 2003/99 e del Regolamento 2160/2003. Lo scopo principale di queste normative è stato quello di aumentare la fiducia dei consumatori negli organi ufficialmente preposti alla tutela della salute pubblica, fiducia seriamente compromessa da crisi alimentari quali quelle legate alla BSE e alla diossina.

Le nuove normative sottolineano come la quantificazione del rischio per la popolazione e la valutazione dell'impatto di eventuali misure di controllo debbano essere basate su dati scientifici certi, applicando quindi la 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. La nuova normativa è inoltre basata sul controllo di filiera, e individua la fase di allevamento come momento critico di diffusione della contaminazione e quindi come punto cardine delle attività di controllo. Ai Paesi Membri viene quindi 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 ed in campo veterinario.

## SICUREZZA ALIMENTARE: LA RETE EUROPEA DEI LABORATORI DI RIFERIMENTO

Alfredo Caprioli

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

Negli anni 2000, la Commissione Europea (EC) ha emanato una serie di provvedimenti in tema di sicurezza alimentare per assicurare che gli alimenti prodotti o importati in Europa abbiano standard elevati e comparabili di sicurezza. Fra questi, il Regolamento EC 882/2004 sui controlli ufficiali ha previsto e disciplinato, al Titolo III, l'istituzione di Laboratori Comunitari di Riferimento (CRL) per specifici "pericoli" nel settore alimenti e mangimi (art. 32). All'art. 33, il Regolamento ha previsto poi l'obbligo per gli Stati Membri di designare uno o più Laboratori Nazionali di Riferimento (NRL) per ogni pericolo/tematica per cui sia stato istituito un CRL.

I CRL per i mangimi e gli alimenti sono responsabili di:

- fornire agli NRL dettagli sui metodi di analisi, compresi i metodi di riferimento;
- coordinare l'applicazione, ad opera degli NRL, di tali metodi, in particolare organizzando test comparativi;
- coordinare le disposizioni pratiche necessarie per applicare nuovi metodi di analisi e informare gli NRL dei progressi in tale ambito;
- condurre attività di formazione a beneficio del personale degli NRL e di esperti dei Paesi in via di sviluppo;
- fornire assistenza scientifica e tecnica alla Commissione;
- collaborare con i laboratori responsabili delle analisi dei mangimi e degli alimenti nei Paesi Terzi.

A loro volta, gli NRL hanno i seguenti compiti:

- collaborare con il CRL nel loro ambito di competenza;
- coordinare le attività dei laboratori ufficiali responsabili dell'analisi degli alimenti e dei mangimi;
- organizzare test comparativi tra i laboratori nazionali ufficiali;
- assicurare la trasmissione all'autorità competente e ai laboratori nazionali ufficiali delle informazioni fornite dai CRL;
- offrire assistenza tecnico-scientifica all'autorità competente.

Attualmente, sono operanti 14 CRL per agenti chimici, 9 CRL per agenti microbiologici (zoonosi), 4 CRL per altre problematiche (latte, biotossine marine, proteine animali nei mangimi, OGM). Gli agenti microbiologici per cui è stato istituito un CRL comprendono: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococchi*, parassiti trasmessi da alimenti, antibiotico-resistenza, contaminazioni batteriche e virali dei molluschi. All'Italia sono stati affidati tre CRL, tutti operanti all'interno dell'Istituto Superiore di Sanità: il CRL per *E. coli*, con particolare riferimento ai ceppi VTEC, il CRL per i parassiti trasmessi da alimenti, il CRL per la contaminazione da metalli pesanti degli alimenti di origine animale.

## ENTER-NET - SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI DA PATOGENI ENTERICI: NUOVA STRUTTURA E ATTIVITÀ 2007-2008

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

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

Enter-net è una rete europea per la sorveglianza delle infezioni enteriche che è stata inserita nel sistema di monitoraggio delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua (*Foodborne and Waterborne Diseases*, FWD) coordinato dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC). La rete ha i seguenti obiettivi: armonizzare i metodi di tipizzazione, mantenere database aggiornati, identificare e controllare gli episodi epidemici a carattere transnazionale. L'Italia è rappresentata nella rete dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che coordina un sistema di sorveglianza costituito da laboratori del Servizio Sanitario Nazionale operanti nei settori umano, veterinario e ambientale. Attualmente il sistema Enter-net Italia consente la notifica *online* ([www.iss.it/ente/](http://www.iss.it/ente/)) degli isolamenti dei principali agenti zoonotici quali *Salmonella*, *Campylobacter* ed *E. coli* O157 e altri patogeni trasmessi da alimenti e acqua. Nel biennio 2007-2008 nell'ambito della rete Enter-net sono state raccolte informazioni relative a 3.377 e 3.326 isolamenti di *Salmonella* da uomo, e 679 e 594 isolamenti di *Campylobacter*. Oltre il 50% degli isolamenti di *Salmonella* appartengono al sierotipo *Typhimurium*, e alla sua variante monofasica 4,5,12:i:-. Gli isolamenti di *S. Enteritidis* continuano a diminuire (22% nel 2007 e 18% nel 2008) mentre sierotipi come *Infantis* e *Napoli* mantengono una frequenza di isolamento relativamente costante e intorno al 3% e 2% rispettivamente. Per quanto riguarda la tipizzazione fagica va sottolineata la diminuzione del fagotipo DT104 di *S. Typhimurium* e quindi del clone multiresistente ACSSuT mentre sono in aumento ceppi di *S. Typhimurium* e della sua variante monofasica con *pattern* di resistenza ASSuT appartenenti a diversi fagotipi o non tipizzabili ma riconducibili ad unico clone diverso da quello della DT104 in base ai risultati della tipizzazione molecolare attraverso l'elettroforesi in campo pulsato. Gli aspetti epidemiologici e di sanità pubblica in parte sovrapponibili a quelli di altri Paesi europei e in parte peculiari rendono importante il proseguimento e lo sviluppo delle attività di sorveglianza. A livello europeo la rete FWD raccoglie in via prioritaria dati epidemiologici e microbiologici sulle infezioni da *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* verocitossina produttore (VTEC), *Listeria*, *Shigella* e *Yersinia*. Per migliorare e razionalizzare le attività a livello nazionale e colmare il debito informativo con l'Europa è necessario da un lato migliorare l'efficienza della rete in tutta Italia potenziando l'attività dei Centri di Riferimento Regionali o ridefinendoli ove fosse necessario, dall'altro raccogliere sistematicamente informazioni su tutti i patogeni inclusi nella lista della rete FWD.

## LE SALMONELLOSI IN AMBITO VETERINARIO

Antonia Ricci, Veronica Cibir, Lisa Barco  
*Laboratorio Nazionale OIE di Riferimento per le Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

Il Regolamento 2160/2003, "sul controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti", definisce la necessità, per talune zoonosi, di stabilire misure di controllo specifiche, che devono essere rapportate ad obiettivi di riduzione graduale della prevalenza.

In applicazione al suddetto regolamento, a livello nazionale sono stati predisposti alcuni piani triennali. Il primo è stato il piano di controllo nei riproduttori della specie *Gallus gallus* (il 2009 è il terzo anno di applicazione), in seguito il piano di controllo nelle galline ovaiole (iniziato nel 2008) ed infine il piano nei polli da carne (a partire da gennaio 2009).

Nei riproduttori l'obiettivo comunitario riguarda 5 sierotipi (*Enteritidis*, *Typhimurium*, *Virchow*, *Infantis* e *Hadar*), per i quali dev'essere raggiunta una prevalenza massima pari all'1% dei gruppi positivi entro la fine del 2009. Nel 2008 sono stati testati 324 gruppi e 13 sono risultati positivi ai sierotipi rilevanti, con una prevalenza del 4%.

L'obiettivo comunitario nelle galline ovaiole adulte della specie *Gallus gallus*, in accordo a quanto stabilito dal Regolamento CE 1168/2006, riguarda *Salmonella* *Enteritidis* e *Typhimurium*, e si configura come una riduzione percentuale minima annuale di gruppi positivi di almeno il 10% se la prevalenza stimata nel precedente anno risultava inferiore al 10%; il piano nazionale di controllo è quindi finalizzato a ridurre la prevalenza di *S. Enteritidis* e *Typhimurium* dall'8,1% (prevalenza stimata sulla base dei criteri definiti dalla Decisione 2004/665/CE) al 7,2% nel primo anno; dal 7,2% al 6,5% nel secondo anno e dal 6,5% a meno del 6% nel terzo anno.

Nel 2008, su 778 gruppi controllati, 50 sono risultati positivi per *S. Enteritidis* o *Typhimurium*, con una prevalenza pari al 6,4%.

Infine, a partire dal 2009, è attivo il piano di controllo nazionale nei polli da carne della specie *Gallus gallus*; gli obiettivi comunitari di riduzione della prevalenza per questa categoria produttiva sono stati stabiliti sulla base dei risultati dello studio relativo alla valutazione della prevalenza di *Salmonella* *spp.* in gruppi di polli da carne effettuato tra ottobre 2005 e settembre 2006 in ottemperanza alla Decisione 2005/636/CE. La prevalenza rilevata nell'ambito di questo studio è risultata pari al 2,3% di gruppi positivi per *S. Enteritidis* o *Typhimurium*.

Anche per i polli da carne, l'obiettivo comunitario riguarda *Salmonella* *Enteritidis* e *Typhimurium* e, in accordo a quanto stabilito dal Regolamento CE 646/2007, prevede una percentuale massima di gruppi positivi pari all'1% entro il 31 dicembre 2011.

I piani prevedono l'applicazione di misure sanitarie restrittive finalizzate a tutelare la salute dei consumatori da applicare quando venga confermata la positività per uno dei sierotipi rilevanti.

## SALMONELLA E AMBIENTE: DATI 2007-2008

Giuseppe Cirillo (a), Daniela Caroli (b), Annamaria Casadei (a), Ida Luzzi (c), Annamaria Manuppella (d), Marina Molina (e), Stefania Scuota (f), Monica Staffolani (g), Alberta Stenico (h)

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

(b) Agenzia Regionale Protezione Ambiente, ARPA, Piemonte, Torino

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

(d) Agenzia Regionale Protezione Ambiente, ARPA, Molise, Isernia

(e) Agenzia Regionale Protezione Ambiente, ARPA, Liguria, Genova

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

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

(h) Agenzia Regionale Protezione Ambiente, ARPA, Bolzano

La ricerca del genere *Salmonella* su matrici ambientali (acque di scarico, acque superficiali, laghi, mare, liquami e fanghi) attraverso un monitoraggio periodico, viene effettuata nei Laboratori di Microbiologia delle Agenzie Regionali di Prevenzione Ambientale (ARPA). Nelle matrici ambientali si assiste a una marcata eterogeneità di specie a differenza di quanto accade nell'uomo e negli animali. In tal modo le acque superficiali sono *habitat* ideale in cui prolifera un *pool* di specie di cui solo alcune compiono il ciclo completo passando agli animali e poi eventualmente all'uomo. Nell'ambito del progetto Enter-net, si sono costituiti i Centri di Riferimento Regionali per la ricerca di *Salmonella sp.* in Piemonte, Liguria, Provincia Autonoma di Bolzano, Emilia-Romagna, Molise, Lazio. Nel biennio 2007/2008, i Laboratori sopra indicati, hanno isolato e tipizzato 4.026 sierotipi di cui 2.860 ambientali, 83 alimentari, 1.008 umani e 75 controlli di qualità. Dei 2.860 ceppi ambientali, circa il 75% proviene da acque superficiali (fiumi, laghi, mare), il 15% da acque di scarico, l'8% da fanghi di depurazione e il 2% da altre fonti (*indoor*, ecc). Si può notare l'alta variabilità di specie che si verifica negli isolamenti da matrici ambientali con 149 sierotipi diversi anche se i Gruppi B/C/D/E/F sono i maggiormente rappresentati. I primi dieci sierotipi (circa il 60% contro il 94% dei *top-ten* umani) isolati da matrici ambientali sono *S. Typhimurium* (16,8%), Veneziana (12,2%), Infantis (5,8%), Derby (5,5%), Agona (4,6%), Montevideo (3,1%), Newport (2,8%), Arizona (2,8%), Brandenburg (2,5%), Muenchen (2,4%). *S. Veneziana*, dopo *S. Typhimurium*, è ancora la specie di maggior isolamento nell'ambiente, anche se, per ora, non trova validi riscontri nell'uomo e negli alimenti. Esiste, invece, una convergenza nei primi dieci sierotipi di 8/10 fra umani e ambientali. *S. Enteritidis*, isolata dal 18,8% delle infezioni umane, rappresenta solo il 0,90% degli isolamenti ambientali. Il completamento rete dedicata di sorveglianza ambientale è sempre auspicabile per garantire una miglior copertura del territorio e la disponibilità di dati più accurati e completi nella conoscenza del movimento profondo di *Salmonella spp.* La variabilità di sierotipi ambientali testimonia la presenza di questo microorganismo in serbatoi naturali non costituiti soltanto da insediamenti agro-alimentari, ma anche da specie selvatiche. Se da una parte è noto che solo alcuni sierotipi parassitano uomo e animali diventando agenti di tossinfezioni non

possiamo escludere a priori che la maggioranza dei 2.400 sierotipi non sia in grado di essere potenzialmente patogena. Ne è un esempio la piccola epidemia sostenuta da *S. Muenchen* (terza con 44 isolamenti) che si è verificata nel 2008 in Provincia di Ravenna. Dai Rapporti annuali degli anni precedenti si nota che la *S. Muenchen* ha presentato sempre stime di isolamenti nell'uomo di poche o nulle unità.

## LA SORVEGLIANZA DELLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI IN PIEMONTE

Renata Magliola

*Centro di Riferimento Regionale Malattie Trasmesse da Alimenti, Torino*

Dal 2002, la Regione Piemonte ha istituito il "Sistema di sorveglianza dei focolai epidemici delle malattie trasmesse da alimenti". Il sistema viene coordinato dal Centro di Riferimento Regionale per la sorveglianza, prevenzione e controllo delle MTA (CRR). Il sistema di sorveglianza prevede la presenza di un Referente MTA nei SIAN delle ASL con l'obiettivo di:

- coordinare e organizzare un gruppo di lavoro aziendale sulle MTA;
- attuare interventi di formazione ed aggiornamento nella propria ASL;
- garantire le segnalazioni settimanali nel Sistema Informativo SIAN regionale.

Tale sistema prevede la raccolta di dati relativi agli episodi epidemici di MTA definiti come "due o più casi di malattia correlati al consumo di un alimento comune". In caso di botulismo, di intossicazioni da funghi, da tossine marine o da sostanze chimiche, anche un solo caso è stato considerato epidemico.

Il monitoraggio prevede anche la registrazione dei casi singoli che si verificano quando malattie trasmesse dagli alimenti hanno colpito singoli individui. Nel 2008, le cause principali di MTA sono state le tossinfezioni alimentari (80% degli episodi), seguite dagli avvelenamenti da funghi (16%) e dalle intossicazioni da istamina (2,7%). Non si sono verificati casi fatali.

Nel 2008, la frequenza regionale di episodi di tossinfezione alimentare è di 1,37 episodi ogni 100.000 abitanti; è un dato di stabilità in quanto la frequenza regionale, nel periodo 2002-2008, è di 1,43 episodi ogni 100.000 abitanti. Il tasso di incidenza regionale di tossinfezioni alimentari per 100000 abitanti è di 9,6 casi di malattia per 100000 abitanti. Il principale agente di tossinfezione alimentare del 2008 è la *Salmonella*, responsabile di oltre la metà degli episodi (53,8%) e del 30,5% dei casi di malattia. Netto il calo delle sindromi legate a istamina, nel 2008. Gli alimenti più frequentemente in causa sono stati, nel 2008, quelli a base di uova (28,6%), seguiti dai prodotti della pesca (12,7%) e da latte/latticini (9,5%). Per quanto riguarda il luogo di insorgenza, nel 2008, la maggior parte degli episodi di tossinfezione alimentare si è verificata nelle abitazioni private (35 episodi pari al 56%), 7 episodi (11%) si sono verificati nella ristorazione collettiva, 8 (13%) presso pubblici esercizi. Nel 75% circa degli episodi di tossinfezione alimentare (74,6%) del 2008 sono stati effettuati accertamenti diagnostici (quasi sempre coproculture) su soggetti malati o esposti, confermando l'andamento dell'ultimo triennio.

In circa la metà degli episodi non si è evidenziato un probabile fattore di rischio.

## **L'IMPEGNO DELLA RETE DEGLI ISTITUTI ZOOFILATTICI SPERIMENTALI NEL PROGRAMMA NAZIONALE DI CONTROLLO DEI VEGETALI**

Paolo Boni

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

In applicazione dell'art. 2, commi 2 e 3 lett. 1), del D.Lgs 270/93, con il decreto del Ministro della Salute del 27 febbraio 2008 sono stati affidati agli IZZSS, compiti di controllo ufficiale in materia di analisi chimiche, microbiologiche e radioattive sugli alimenti di origine vegetale.

Le finalità del conseguente Piano nazionale di controllo degli alimenti di origine vegetale, analisi microbiologiche, predisposto dalla rete degli IZZSS consistono nel verificare il grado di osservanza degli obblighi previsti dalla normativa comunitaria in materia di sicurezza alimentare e fornire inoltre a tutte le Autorità coinvolte nel sistema dei controlli informazioni esaustive sulla struttura e sull'organizzazione dei controlli ufficiali (descrivendo a tal fine ruoli, responsabilità, competenze, relazioni gerarchiche e funzionali degli organismi coinvolti), nonché sui sistemi di controllo adottati e sulle risorse umane e finanziarie impiegate.

Costituiscono obiettivi prioritari del Piano, quelli di garantire:

- adeguati livelli di sicurezza;
- lo svolgimento di controlli omogenei e coordinati su tutto il territorio nazionale;
- il miglioramento dell'efficienza degli interventi di controllo attraverso un miglior utilizzo delle risorse finanziarie e umane;
- l'aumento di efficacia degli interventi di controllo.

Il piano è rivolto più in particolare a:

- fornire direttive alle professionalità coinvolte nei controlli ufficiali circa la tipologia dei controlli da effettuare, le categorie di prodotto e il numero dei campionamenti ufficiali necessari per assicurare gli obiettivi previsti dal piano;
- raccogliere i dati razionalmente utili a impostare una corretta valutazione del rischio;
- migliorare progressivamente la tutela del consumatore nei confronti delle materie prime, dei semilavorati e dei prodotti finiti.

Le attività di servizio e di controllo che il piano dei controlli individua hanno come obiettivo:

- la "sicurezza alimentare" intesa come sfida da affrontare sul campo della produzione, trasformazione, trasporto e commercializzazione delle derrate destinate al consumo umano;
- il "miglioramento della salute" dei cittadini, attraverso l'attuazione di tutte le misure in grado di impedire o ridurre il verificarsi di condizione di esposizione a livelli di rischio inaccettabili;
- lo sviluppo e il miglioramento del "livello di qualità degli alimenti" immessi sul mercato nazionale, ma destinati anche a quello comunitario e globale;

- in generale di contribuire indirettamente a ridurre i costi sanitari legati a problemi di alimentazione e, quindi, a conseguire un maggior grado di salute in un quadro di utilizzo più razionale delle risorse.

Oggetto del piano è la sicurezza alimentare, peraltro intesa, in coerenza con la normativa comunitaria, come comprensiva in particolare della salubrità e qualità dei vegetali che entrano nella catena alimentare.

In dettaglio le aree di attività che sono state considerate per la programmazione del controllo ufficiale dei prodotti alimentari non hanno potuto prescindere da quanto previsto da *"Guidance on the scope of single integrated multiannual national control plans"* che costituisce il Cap. 5 delle *"Guidelines to assist Member States in preparing the single integrated multi-annual national control plan provided for in Regulation EC n. 882/2004 of the European Parliament and of the Council"*.

Conformemente a quanto previsto dal citato Capitolo 5 delle Linee guida della Commissione e dell'articolo 42 del Regolamento 882/2004 CE) le aree di attività alle quali si fa prioritario riferimento sono:

- sicurezza e qualità degli alimenti;
- igiene generale delle produzioni;
- sanità delle piante (rif. Capitolo 3 della Linea Guida della Commissione);
- corretta etichettatura e indicazioni nutrizionali;
- OGM;
- controllo delle salmonelle e degli agenti zoonosici;
- produzioni biologiche;
- prodotti tutelati (DOP, IGP, DOC, DOCG).

Rispetto a questi contenuti il programma costituisce un'azione di sistema comprensiva, in modo equilibrato e scientificamente sostenibile, dei controlli effettuati sui prodotti importati da Paesi Terzi extracomunitari e da quelli di produzione nazionale destinati al mercato interno o ai mercati esteri, comunitari ed extracomunitari.

## INFEZIONI DA SALMONELLA E ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

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

*Sezione di Medicina Clinica e Sanità Pubblica, Dipartimento di Medicina Sperimentale,  
Università di Roma Sapienza, Roma*

**Introduzione.** Le infezioni da Salmonella permangono un problema di Sanità Pubblica irrisolto, a giudicare dagli alti tassi di notifica in USA (12,2 casi/100.000 abitanti, CDC, 2008), in Europa (34/100.000, European CDC, 2008) ed Italia dove, nel 2005, le Salmonellosi non tifoidee, hanno presentato un tasso di incidenza di 13,77 casi/100.000 residenti (Osservasalute, 2008). Il rischio salmonellosi pone sfide di carattere organizzativo, gestionale ed operativo in termini di sorveglianza, controllo e comunicazione del rischio, che necessitano di un approccio preventivo multidisciplinare. Recentemente, alimenti di origine vegetale della filiera I e IV Gamma sono stati correlati a rischio salmonellosi. Le allerte comunitarie riguardanti vegetali *Ready To Eat* (RTE) italiani, richiedono l'acquisizione di evidenze scientifiche sui determinanti ambientali-tecnologici-etiologicali influenti sulla qualità microbiologica e sicurezza d'uso di questi prodotti.

**Obiettivi.** Utilizzare i risultati di uno studio condotto a livello nazionale nel periodo 2004-2007 su finanziamento MIPAAF/INRAN (D.M. 591/7303/02) e finalizzato alla valutazione della sicurezza microbiologica di insalate RTE in rapporto alle differenti tecnologie, per progettare e validare un modello di sorveglianza integrato "ambiente-tecnologia-etiologicala", per valutare i determinanti del rischio ed individuare efficaci strategie di prevenzione.

**Metodi.** Il Progetto MIPAAF/INRAN ha consentito di acquisire conoscenze approfondite sulle produzioni (RTE) di tre imprese del Centro-Sud Italia. Sono stati collezionati 964 campioni di cui 265 materie prime (MP: insalata riccia, rucola, scarola, radicchio, lattughino, pan di zucchero) ed 699 Prodotti Finiti (PF) prelevati sul mercato distributivo romano ed analizzati a 24 h dal confezionamento (T1), entro il periodo di massima conservabilità (T2=5gg Azienda A, T2=7gg Aziende B e C), per la ricerca di *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e carica mesofila totale (CMT) con metodiche colturali ISO e PCR-BAX System® (AFNOR/AOAC).

**Risultati.** Assenti *Salmonella spp.* ed *E. coli* O157:H7 nei prodotti finiti. Una positività (ISO e PCR) per *Salmonella* Umbilo O:28 in rucola MP. Due campioni di PF/699 (0,003%) sono risultati PCR-positivi per *L. monocytogenes*. Nel 18,9% dei PF (4,3%AzA; 5,2%AzB e 9,4%AzC) è stato rilevato *E. coli* a concentrazione >1.000ufc/g (limite Reg. 1441/2007/CE).

**Conclusioni.** Accertata la sicurezza d'uso delle produzioni analizzate sempre conformi ai criteri di sicurezza igienico-sanitaria del Regolamento 1441/2007/CE. La qualità microbiologica è risultata associata al rispetto delle buone pratiche agricole e dell'autocontrollo. I risultati hanno consentito di individuare i determinanti influenti la sicurezza d'uso (acque, cultivar, GAP, GMP, HACCP, territorio) da inserire nel modello di sorveglianza che verrà avviato in ottobre 2009 nella stessa area geografica.

## **GASTROENTERITE DA NOROVIRUS: EPIDEMIOLOGIA E FOCOLAI EPIDEMICI ITALIANI**

Franco Maria Ruggeri

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

I Norovirus (NoV) rappresentano la causa principale di gastroenterite epidemica nel mondo, che coinvolge non solo soggetti in età pediatrica ma anche l'adulto. Norovirus è uno dei quattro generi della famiglia Caliciviridae, e sono caratterizzati da un genoma ad RNA a singola catena positivo diviso in tre ORF, racchiuso in un capsido di circa 30 nm costituito dalla proteina principale VP1 (codificata dall'ORF2) e da una proteina secondaria, VP2 (ORF3). Il genoma è altamente variabile e sono noti 5 genogruppi (GGI-V) e oltre 30 genotipi virali, con diversità nucleotidiche rispettivamente di oltre il 30% e del 15-30%, che rendono la diagnostica molecolare (RT-PCR, *real-time* PCR) e immunologica (kit ELISA commerciali) soggetta a relativa insensibilità. La trasmissione dei NoV è fecale-orale, per passaggio diretto interumano o tramite alimenti (frutta, verdura, molluschi, acque) o ambientale, favorita dall'elevata resistenza dei virus nell'ambiente e nei materiali organici, sia clinici che alimentari, e dalla bassa carica infettante (<100 particelle). La diffusione del virus nel corso delle epidemie, è favorita dal vomito e i tassi di attacco superano il 70% dei soggetti esposti specie in ambienti confinati, quali hotel e ristoranti, residenze ed ospedali, scuole, villaggi turistici e navi. Si stima che oltre il 50% di tutte le epidemie riportate come tossinfezioni alimentari siano da attribuirsi a Norovirus, a livello mondiale; inoltre, i NoV stanno emergendo come il secondo più importante agente causale di gastroenterite acuta (AGE) pediatrica tra i soggetti ospedalizzati, dopo i rotavirus. Nonostante l'assenza di un sistema nazionale di sorveglianza delle AGE in Italia, i NoV sono descritti come causa di un numero crescente di epidemie anche nel nostro Paese. Attraverso progetti collaborativi in ambito EC, è stato possibile dimostrare che in Italia circolano gli stessi ceppi virali riportati in altri Paesi Europei, anche attraverso veicoli alimentari di importazione, quali frutti di mare. Nell'ultimo decennio, attività coordinate a livello europeo hanno consentito di individuare fonti comuni di infezione, rischi legati alle attività umane e simili *patterns* di evoluzione dei ceppi di NoV diffusi nel territorio italiano.

## **RISCHIO DI INFEZIONE DA *E. COLI* PRODUTTORE DI VEROCITOTOSSINA E CONSUMO DI LATTE CRUDO**

Gaia Scavia, Martina Escher, Francesca Baldinelli, Alfredo Caprioli  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La Sindrome Emolitico Uremica (SEU) è la causa più comune di insufficienza renale acuta nei pazienti pediatrici. La maggior parte dei casi fa seguito all'infezione da *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC). Nell'ambito delle attività di sorveglianza epidemiologica della SEU che l'Istituto Superiore di Sanità effettua in collaborazione con il Registro Nazionale della SEU pediatrica, dal 2005 è in corso uno studio caso controllo per l'identificazione dei fattori di rischio associati alla SEU pediatrica. I controlli (fino a 3 per ciascun caso e appaiati per età) sono stati reclutati tra gli assistiti dello stesso pediatra di famiglia del caso. Sono stati indagati come fattori di rischio l'esposizione a diverse potenziali fonti di VTEC: alimentare, ambientale, contatti con ruminanti, acque di bevanda e ricreative, contatti con persone con sintomi riferibili a patologia gastroenterica. L'analisi dei dati è stata effettuata tramite un modello multivariato di regressione logistica. Il valore di *Odds Ratio* (OR) più elevato è stato ottenuto per il consumo di latte crudo non pastorizzato (OR=8,3; 95% CI: 1,3-51,7) che rappresentava anche l'unico cibo associato ai casi di SEU. Le normative dell'Unione Europea consentono a ciascun Paese Membro di vietare o limitare la vendita del latte crudo non pastorizzato. Nel nostro Paese è legale la cessione diretta dal produttore al consumatore, nell'ambito del territorio provinciale ove è ubicata l'azienda produttrice e province limitrofe. L'introduzione di distributori automatici per la vendita del latte crudo nelle aree adiacenti ai supermercati, scuole, parcheggi, centri commerciali ha reso questo prodotto facilmente disponibile al pubblico. Il minor costo del latte crudo, la possibilità di identificare l'azienda produttrice e la convinzione che tale prodotto abbia proprietà nutrizionali superiori rispetto al latte pastorizzato sono alla base della crescente popolarità del prodotto. I risultati preliminari del nostro studio unitamente ad altre evidenze disponibili nel nostro Paese indicano che il rischio sanitario connesso al consumo del latte crudo è tutt'altro che trascurabile. È pertanto necessario individuare efficaci strumenti di riduzione del rischio nell'ambito della produzione primaria, di comunicazione del rischio e di educazione del consumatore che deve essere consapevole dei pericoli connessi al latte crudo e conoscere le corrette modalità di gestione e consumo del prodotto.

**Comunicazioni orali e Poster**



## **P1 CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* CIPROFLOXACINA-RESISTENTI ISOLATI DA INFEZIONI EXTRA-INTESTINALI DELL'UOMO: EMERGENZA DEL CLONE ST-131**

Marisa Accogli, Maria Giufrè, Aurora García-Fernández, Daniela Fortini, Ida Luzzi, Alessandra Carattoli, Marina Cerquetti  
*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Introduzione.** Nell'uomo, infezioni extra-intestinali associate a ceppi patogeni di *E. coli*, definiti ExPEC, sono piuttosto comuni e rappresentano un problema emergente nell'ambito della salute pubblica. Recentemente si è osservato un consistente e generale incremento di ceppi ExPEC resistenti ai fluorochinoloni, antibiotici considerati di prima scelta nel trattamento di tali infezioni. Scopo di questo studio è stato investigare le basi molecolari della resistenza in ceppi ExPEC isolati da infezioni urinarie e da casi di setticemia in pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali.

**Obiettivi.** 1) Investigare la resistenza ai fluorochinoloni mediata sia da mutazioni cromosomiche nei geni bersaglio delle topoisomerasi II (*gyrA*, *gyrB* e *parC*), sia dai determinanti genetici *qnr* e *aac(6')-Ib-cr*, localizzati su plasmidi; 2) investigare la resistenza ad antibiotici beta-lattamici, ovvero ricercare la presenza di geni codificanti beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL); 3) definire le relazioni filogenetiche tra ceppi antibiotico-resistenti individuando i principali cloni circolanti.

**Metodi.** Sono stati analizzati 64 ceppi ciprofloxacina-resistenti isolati da casi di infezioni urinarie e da casi di setticemie. Il campione è stato esaminato per il fenotipo di resistenza. Mediante PCR si sono ricercati i geni *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, il gene *aac(6')-Ib-cr* e i geni codificanti ESBL (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>OXA</sub>*). I plasmidi sono stati caratterizzati mediante *southern blotting*, trasferibilità e *replicon typing*. Nei ceppi risultati positivi ad almeno uno dei suddetti *markers* di resistenza sono state analizzate le mutazioni nelle Regioni di resistenza ai chinoloni (QRDR) dei geni *gyrA*, *gyrB* e *parC*, il gruppo filogenetico, il profilo PFGE ed MLST.

**Risultati.** Dei 64 ceppi, 15 (23%) risultavano produttori di ESBL. Tutti i ceppi ESBL positivi albergavano il gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, ad eccezione di un unico ceppo (*bla<sub>SHV-12</sub>*-positivo) e la maggioranza risultavano positivi anche per il gene *aac(6')-Ib-cr* (11/15). Due ceppi non produttori di ESBL albergavano entrambi i geni *qnrB1* e *aac(6')-Ib-cr*. Mediante MLST, la maggioranza dei ceppi produttori di CTX-M-15 e positivi per il gene *aac(6')-Ib-cr* appartenevano al gruppo clonale ST-131 (71%), associato al gruppo filogenetico B2 (11/11). Questo clone è risultato invariabilmente associato ad uno specifico *pattern* di sostituzioni nei geni delle topoisomerasi in grado di conferire alta resistenza alla ciprofloxacina.

**Conclusione.** Il clone epidemico di *E. coli* ST-131 prevale nel nostro Paese tra ceppi ExPEC resistenti sia ai fluorochinoloni sia a beta-lattamici ed isolati sia in ambito ospedaliero sia in comunità. L'ampia diffusione di questo clone rappresenta un serio elemento di preoccupazione nel trattamento delle infezioni extraintestinali umane causate da *E. coli*.

## INDAGINE EPIDEMIOLOGICA DI UN CLUSTER DI CASI DI SINDROME EMOLITICO UREMICA ASSOCIATA A INFEZIONE DA VTEC O55

Francesca Baldinelli (a), Martina Escher (a), Gaia Scavia (a), Anna Duranti (b), Fabio Minelli (a), Maria Luisa Marziano (a), Monica Staffolani (c), Alfredo Caprioli (a)

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

(b) Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, Ancona

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

**Introduzione.** La Sindrome Emolitico Uremica (SEU) costituisce la più grave manifestazione clinica delle infezioni da *Escherichia coli* produttori di Verocitotossina (VTEC). Nel mese di aprile 2009 il Registro Nazionale della SEU pediatrica ha registrato la segnalazione di due bambini con SEU residenti ad Ancona e Forlì. Le preliminari indagini epidemiologiche avevano evidenziato per entrambi, una possibile acquisizione dell'infezione via persona-persona, ma escluso legami epidemiologici. Le indagini di laboratorio sui campioni fecali dei pazienti, condotte dal Laboratorio Nazionale di Riferimento presso l'ISS, conducevano tuttavia all'isolamento per entrambi di un ceppo VTEC O55 (*vtx2+*, *eae+*). Poiché O55 è un sierogruppo non comune, è stato ipotizzato un legame tra i due casi.

**Metodi.** L'approfondimento delle indagini ha consentito di individuare la possibile fonte comune in un agriturismo, presso il quale avevano pranzato, a distanza di 24 ore, i familiari di entrambi i pazienti. È stata condotta un'indagine epidemiologica raccogliendo informazioni sui partecipanti ai pranzi, sugli alimenti consumati, e sui sintomi occorsi nei giorni successivi. L'associazione tra i casi di gastroenterite, il consumo di alimenti e il contatto con animali nell'agriturismo è stato indagato tramite un studio retrospettivo di coorte. Sono stati inoltre sottoposti alle indagini di laboratorio per VTEC campioni di feci dei familiari, degli addetti alla ristorazione, degli alimenti prodotti presso l'agriturismo, nonché latte e feci delle pecore allevate.

**Risultati.** Sono stati individuati 4 casi di gastroenterite tra i 21 partecipanti rintracciati. I casi di gastroenterite non sono risultati significativamente associati agli alimenti né al contatto con gli animali. Da un familiare e da due addetti sono stati isolati ceppi VTEC di sierogruppo non tipizzabile, con diverse combinazioni dei geni di virulenza, *vtx1*, *vtx2* ed *eae*. Evidenza di infezione è stata inoltre ottenuta per un altro familiare (presenza di VT libera nelle feci). Tutti gli alimenti esaminati sono risultati negativi, mentre uno dei *pool* di feci ovine è risultato positivo alla ricerca, mediante PCR, dei geni *vtx1* e *vtx2*.

**Conclusioni.** Le indagini condotte non hanno permesso di identificare la fonte primaria di VTEC O55. Ciò nonostante, l'integrazione delle informazioni epidemiologiche e di laboratorio si conferma uno strumento indispensabile per attuare un'efficace indagine dei casi di malattia. Infatti, solo la segnalazione della presenza di un sierogruppo "raro" ha consentito di mettere in relazione due casi apparentemente non correlati. Il lungo tempo intercorso tra il momento in cui è avvenuta l'infezione e la conduzione delle indagini,

potrebbe aver impedito, infatti, di accertare definitivamente il link epidemiologico tra i pazienti. Il ruolo del ristorante rimane, comunque, molto probabile viste le scarse condizioni igieniche di produzione degli alimenti e la presenza di una forte contaminazione ambientale da VTEC.

## **P2 FORMAGGI A PARTIRE DA LATTE CRUDO: RISULTATI DEI CONTROLLI UFFICIALI NEL PERIODO 2004-2008 IN PIEMONTE**

Antonio Barbaro, Laura Chiavacci, Silvia Gallina, Lucia Decastelli  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

**Introduzione.** Negli ultimi anni i formaggi prodotti a partire da latte crudo sono stati oggetto di interesse da parte della Comunità Europea. La Raccomandazione della Commissione, del 19 dicembre 2003, "relativa a un programma coordinato di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2004" aveva posto le basi per attuare programmi coordinati di controllo finalizzati ad evidenziare la qualità igienico-sanitaria di tali prodotti. La Regione Piemonte ha ritenuto utile garantire attraverso il piano di controllo alimenti un adeguato livello di controllo su questa tipologia di prodotto che risulta molto apprezzato dai consumatori. Questo contributo scientifico punta ad evidenziare i risultati ottenuti nel periodo 2004-2008 rispetto alla presenza di microrganismi patogeni quali *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* ed *E. coli* O157.

**Metodi.** Nel periodo 2004-2008 i servizi veterinari delle ASL piemontesi hanno prelevato e consegnato presso i laboratori controllo alimenti dell'IZSPLV 845 campioni di formaggio a latte crudo per la ricerca di *Salmonella spp.*, 865 per la ricerca di *L. monocytogenes* e 168 per la ricerca di *E. coli* O157. I campioni sono stati analizzati secondo i metodi: AFNOR V08-052 o ISO 6579:2002 per la rilevazione di *Salmonella spp.*; ISO 11290 o 11290-2:1996 per *L. monocytogenes*; AFNOR BIO 12/8-07/00 e ISO 16654:2001 per *E. coli* O157. Per questo lavoro, il campione positivo è stato classificato in funzione del risultato della prima analisi prescindendo dall'eventuale negatività alla ripetizione del parametro difforme.

**Risultati.** Nel periodo di osservazione la percentuale di campioni positivi per *Salmonella spp.* è stata pari allo 0,2 (2/845). *L. monocytogenes* è stata rilevata in 8 campioni su 865 controllati (0,9% positività). Non è stata rilevata nessuna positività per *E. coli* O157.

**Conclusioni.** L'assenza di isolamento di *E. coli* O157 appare confortante; tuttavia il rilevamento di altri patogeni disegna per questi prodotti, uno scenario non esente da rischi per il consumatore. L'attenzione degli organi di controllo su questi prodotti deve tendere alle massime garanzie igienico sanitarie della materia prima che, non essendo sottoposta ad alcun trattamento termico, può essere fonte di eventuali contaminazioni pericolose. Va ricordato, inoltre, che spesso si tratta di produzioni tradizionali fortemente vincolate al territorio, sia per l'origine delle materie prime che per le modalità di trasformazione; tuttavia occorre esigere l'adozione delle buone pratiche di produzione perché il riscontro di tali patogeni riduce il livello di sicurezza e accettabilità di questi formaggi aumentando il rischio per il consumatore.

## **P3** INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN CORSO DI EPISODI DI TOSSINFEZIONE ALIMENTARE: UTILIZZO DELLA PFGE PER CONFRONTO DI CEPPI DI *SALMONELLA* A CONFERMA DELL'ALIMENTO SOSPETTO

Daniela Manila Bianchi (a), Silvia Gallina (a), Rosella Bruno (b), Salvatore Di Gioia (c), Renata Magliola (c), Rosaria Risiglione (d), Salvatore Russo (d), Flavia Foltran (e), Maria Cristina Dalla Pozza (f), Lucia Decastelli (a)

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

(b) *Servizio Sanitario Microbiologia, Ospedale di Chivasso, Torino*

(c) *Centro di Riferimento Regionale Malattie Trasmesse da Alimenti, Direzione Sanità, Regione Piemonte, Torino*

(d) *Servizio SIAN, ASL TO4, Settimo Torinese, Torino*

(e) *Pediatra, ASL TO4, Settimo Torinese, Torino*

(f) *Centro Referenza Salmonellosi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

**Introduzione.** Secondo il Report 2008 realizzato a cura del Centro di Riferimento Regionale per la sorveglianza, la prevenzione e il controllo della Malattie Trasmesse da Alimenti (MTA), nella Regione Piemonte nel periodo 2002-2007 si sono registrati 376 focolai epidemici di MTA per un totale di 2.634 soggetti sintomatici. Di questi, in soli 49 casi (13%) è stato possibile reperire l'alimento responsabile della tossinfezione; inoltre per il 25,8% circa dei focolai epidemici non è stato possibile identificare l'agente responsabile. Identificare l'alimento contaminato e isolare il microrganismo responsabile della sintomatologia appaiono obiettivi di fondamentale importanza in corso di MTA, sia per una corretta gestione delle reportistiche dei centri di sorveglianza ma anche, e soprattutto, per un approccio efficace alla prevenzione e al controllo delle malattie alimentari. Nel presente lavoro si riporta l'attività svolta durante un episodio di MTA avvenuto nel 2009 in provincia di Torino, che ha visto coinvolte varie strutture e durante il quale si sono impiegate tecniche analitiche supplementari a quelle ufficiali, al fine di confermare il patogeno responsabile della intossicazione.

**Metodi.** In data 08/06/2009, un paziente di 8 anni con diarrea e febbre elevata ha richiesto l'intervento a domicilio del Medico Pediatra curante. Al fine di confermare un'eventuale salmonellosi, un campione di feci è stato analizzato (metodo colturale) presso il laboratorio dell'Ospedale di Chivasso. Il Servizio SIAN di Settimo Torinese dell'ASL TO4, ha avviato l'indagine epidemiologica con la consegna, presso il laboratorio Controllo Alimenti dell'IZSPLV, di alimenti prelevati al ristorante dove il paziente aveva pranzato il giorno precedente la comparsa dei sintomi. Le analisi sono state eseguite con ISO 6579:2002.

**Risultati.** Dal campione di feci e da un involtino di prosciutto è stato possibile isolare *Salmonella enterica*: in seguito a sierotipizzazione (IZSPLV) e fagotipizzazione (Centro di Referenza presso IZSVE) i ceppi sono risultati, in entrambi i casi, appartenere al sierotipo

Enteritidis e fagotipo PT4. I due ceppi sono stati sottoposti a restrizione enzimatica con enzima X-BaI e a corsa elettroforetica in campo pulsato (PFGE) generando un identico pulsotipo (profilo DICE 100%).

**Conclusioni.** Le metodiche tradizionali hanno permesso di isolare ed identificare *Salmonella* Enteritidis come responsabile dell'episodio. L'indagine biomolecolare ha confermato il passaggio del ceppo da un alimento contaminato al paziente. Il lavoro congiunto di diverse strutture pubbliche (Ospedale, IZSPLV, SIAN, Centro MTA) non solo ha permesso di identificare l'alimento responsabile della sintomatologia ma ha inoltre consentito di confermare con metodi di biologia molecolare l'origine clonale dei ceppi isolati dalla matrice alimentare e da quella biologica.

## **P4 LE MALATTIE TRASMESSE DA ALIMENTI (MTA) NELLA REGIONE TOSCANA. 7 ANNI DI ATTIVITÀ DEL Ce.R.R.T.A.-CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE SULLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI**

Emanuela Balocchini (a), Costanza Pierozzi (b) Paola Piccioli (b)

(a) *Direzione Generale, Diritto alla Salute Settore Igiene Pubblica, Regione Toscana, Firenze*

(b) *Azienda USL 3, Pistoia*

**Introduzione.** Con Deliberazione Regionale n. 1241/8.11.1999 è stato istituito il Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari (Ce.R.R.T.A.). Il Centro raccoglie, vaglia, raggruppa e studia le denunce relative agli episodi tossinfettivi provenienti dalle competenti strutture delle ASL, arricchisce le conoscenze scientifiche degli operatori in merito alle metodologie epidemiologiche di approccio e di corretto riconoscimento degli agenti eziologici implicati.

**Metodi.** Mediante un database in ACCESS fornito a tutti gli operatori sanitari delle USL della Toscana, i dati relativi agli episodi di MTA indagati nella Regione vengono inviati a due subunità del Ce.R.R.T.A., analizzati, integrati, ampliati e successivamente inviati al Coordinamento Regionale che ha sede presso l'Azienda USL 3 di Pistoia. Qui i dati vengono aggregati, elaborati ed inviati, attraverso bollettini informatizzati e report annuali, a tutto il personale che opera nell'attività di prevenzione e controllo delle malattie veicolate da alimenti. L'attività del Ce.R.R.T.A. si esplica anche attraverso la gestione di un sito WEB ([www.usl3.toscana.it/cerrta/index.htm](http://www.usl3.toscana.it/cerrta/index.htm)) in cui gli operatori del settore reperiscono materiale utile all'ampliamento delle conoscenze in materia di gestione e controllo degli episodi di MTA.

**Risultati.** I dati si riferiscono agli episodi di focolai verificatisi in Toscana negli anni 2002-2008. I focolai sono stati 285 con 3.010 casi coinvolti ed un'incidenza di 1,13 episodi/100.000 abitanti e 11,9 casi/100.000 abitanti. Il 46,2% degli episodi si è sviluppato in ambiente non-domestico (ristoranti, mense, RSA, aziende artigianali ecc.) ed il 48,9% in ambiente domestico, con un *trend* che vede negli ultimi anni gli episodi domestici in crescita rispetto agli altri. Gli agenti più frequentemente responsabili degli episodi sono le Salmonelle non tifoidee seguite da *Clostridium perfringens* con un'alta percentuale degli episodi in cui l'agente responsabile non è stato individuato. I veicoli responsabili (accertati e sospetti) sono in maggior percentuale le uova e derivati e la carne.

**Conclusioni.** L'impegno che la Regione Toscana ha profuso nell'implementare un sistema di sorveglianza delle MTA fa sì che la percentuale di episodi investigati sia sempre superiore alla media italiana come accade in altre Regioni in cui esistono sistemi di sorveglianza speciali. È ancora alta la percentuale di episodi non segnalati, non investigati e dei quali non si sono individuate le cause. L'impegno del Ce.R.R.T.A. è attualmente indirizzato a fornire ulteriori strumenti alle Aziende affinché tali carenze siano in qualche modo colmate, in modo da avvicinare il più possibile i metodi agli standard europei.

## **SALMONELLOSIS IN ITALY: 2002-2006**

Luca Busani (a), Caterina Graziani (a), Anna Maria Dionisi (b), Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (b)

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

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

*Salmonella* is the second most commonly reported zoonotic agent in EU. In Italy, similarly to the majority of the EU Member States (MSs), the incidence of salmonellosis is decreasing in the last years. However, differences in the epidemiology of *Salmonella* in comparison to the other MSs were observed. This study describes the salmonellosis in Italy, in order to improve surveillance and prevention activities at national level. A descriptive study was performed using the 2002-2006 data from the national infectious diseases notification system (SIMI) and the Enter-net surveillance system. The hospitalization data were obtained for the year 2005 from the hospital discharge records. No data on outbreak investigation or source of human infections were available for the study period. Overall, SIMI collected 45,338 notifications. Annual rates ranged between 3 and 93/100,000 among the regions. The cases decreased from 18/100,000 in 2002 to 11/100,000 in 2006, with a sharper reduction in the North of Italy (from 25 to 14/100,000). The 64.5% of the cases occurred in the 0-14 years age class. Enter-net provided data on 23,923 isolates. The main serovars were *S. Typhimurium* (43.6%), *S. Enteritidis* (30.5%) and *S. Infantis* (2.6%). The hospital discharges for enteric salmonellosis (ICD9-0030) were 3,330 (40% of the SIMI 2,005 cases) with a mean stay of 5.7 days. Salmonellosis in Italy is decreasing as in EU, but the dominance of *S. Typhimurium* could be related to differences in the source of human exposure. Compared to other studies, the hospitalization rate was higher but the mean stay was shorter. The surveillance needs to be harmonized at the national level, under-reporting and risk factors identification for human infections are main constrains to improve salmonellosis prevention in Italy.

## PREVALENZA DI *E. COLI* VEROCITOTOSSICI IN OVINI MACELLATI IN SARDEGNA: RISULTATI PRELIMINARI

Gianluca Busia, Anna Mureddu, Roberta Mazza, Maria Mulas, Laura Lasio, Rita Melillo, Domenico Meloni, Rina Mazzette

*Dipartimento di Biologia Animale, Sezione Ispezione degli Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Sassari*

**Introduzione.** I bovini costituiscono il principale reservoir di *E. coli* Verocitotossici (VTEC), ma anche gli ovini svolgono un importante ruolo nella trasmissione all'uomo. In questa specie sono stati evidenziati sottotipi geneticamente distinti di Shigatossine (*Stx1c* e *Stx2d*), caratterizzati da minore patogenicità, isolati in pazienti con sintomi di diarrea non complicata. Scopo del presente lavoro è la valutazione del ruolo degli ovini nella diffusione dei VTEC attraverso le carni, mediante:

- standardizzazione di un metodo rapido per la ricerca diretta;
- studio della prevalenza in ovini allevati e macellati in Sardegna;
- valutazione delle misure da applicare in macello per la prevenzione della contaminazione delle carcasse.

**Metodi.** Da pecore e agnelli macellati in Sardegna sono stati prelevati n. 150 campioni di:

- raschiato della mucosa di colon e retto;
- cute dell'addome e del petto;
- superficie delle carcasse mediante *sponges*.

Per ciascun campione veniva allestita una brodocoltura in *Modified-Tryptone Soya Broth*, contenente novobiocina. Ciascuna brodocoltura veniva sottoposta a *screening* preliminare per la determinazione dei geni *stx1/stx2*, secondo la metodica *EU Food PCR Project*, modificata. I campioni positivi venivano sottoposti a separazione immunomagnetica (IMS) per i sierogruppi O157 e O26 e semina su CT-SMAC e CT-RMAC. Gli isolati VTEC + venivano identificati con il sistema API 20E e sottoposti alla ricerca, mediante PCR, del gene *eae* che codifica per l'intimina. Sui ceppi *eae*- sono stati inoltre ricercati i geni per l'adesina (Saa) e per la citotossina subtilasi (SubAB). Sui sospetti O157 è stata inoltre eseguita la siero-agglutinazione *in vitro*.

**Risultati.** La metodica rapida PCR ha evidenziato una prevalenza dei VTEC del 9,3% (pecore 15%, agnelli 5,5%): risultavano positivi campioni di cute (6,6%) e mucosa intestinale (2,6%). Dai terreni selettivi sono stati isolati: n. 11 presunti O157, provenienti da matrici prelevate in stabilimenti distinti, risultati tuttavia negativi alle prove di agglutinazione; n. 5 presunti O26, da cute di pecore dello stesso stabilimento; n. 2 ceppi, isolati da cute di pecora, non presentavano invece caratteristiche riferibili a O157 e O26. Tutti gli isolati VTEC + sono risultati *E. coli* all'identificazione di specie. Per n. 8 ceppi è stato evidenziato il gene *eae*.

**Conclusioni.** I risultati preliminari evidenziano una prevalenza di ovini portatori di VTEC più elevata rispetto a quanto riportano altri autori (0,3-7% per O157:H7), mentre risulta inferiore il numero di carcasse contaminate. Ai fini dell'approfondimento del ruolo degli ovini sarà completata la definizione del profilo dei sierotipi e dei fattori di virulenza ad essi associati.

## **PS MALATTIE TRASMISSIBILI DA ALIMENTI (MTA): L'IMPORTANZA DI PROCEDURE CONDIVISE PER IMPLEMENTARE IL SISTEMA DI SORVEGLIANZA E CONTROLLO**

Maria Rosaria Carullo (a), Rosa Alfieri (c), Daniela Bove (a), Roberta Baldoni (b), Vincenzo Caligiuri (a), Antonino Parlato (c), Alessandro Parlato (b), Yolande Thérèse Rose Proroga (a), Sabatino Russo (b), Vincenzo Zinno (b), Giorgio Liguori (d), Achille Guarino (a), Giuseppe Iovane (a)

*(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli*

*(b) Area Sanità Pubblica Veterinaria, ASL NA2 NORD, Napoli*

*(c) Area Dipartimentale di Epidemiologia e Prevenzione, ASL NA2 NORD, Napoli*

*(d) Università degli Studi Parthenope, Napoli*

**Introduzioni.** Le Malattie Trasmissibili da Alimenti (MTA) rappresentano un problema rilevante di Sanità Pubblica e, tra le tossinfezioni alimentari, la salmonellosi è la più importante sia in termini di salute dei cittadini che di costi sociali. Dati ufficiali riportano un tasso di incidenza dimezzato dal 2000 al 2007: da 2 a 1 caso/10.000 abitanti; a questi vanno poi aggiunte le sottonotifiche e gli eventi con blanda sintomatologia. Tali motivazioni hanno suggerito di progettare uno studio pilota finalizzato alla creazione di procedure standardizzate di collaborazione tra Enti e strutture diverse che, in tempi brevi e senza sovrapposizione di ruoli, possano giungere all'individuazione causa-effetto nella sorveglianza delle MTA. Punto fondamentale è la creazione di una banca dati, assente al momento nella nostra Regione, che raccolga informazioni sugli isolamenti in ambito umano ed alimenti il sistema di sorveglianza nazionale Enter-net presso l'ISS. Si progetta di raggiungere tale obiettivo tramite protocolli d'intesa tra l'IZSM e i principali nosocomi regionali. Essi forniranno ceppi che saranno oggetto di approfondite caratterizzazioni e confronti con quelli isolati da altre matrici (alimenti, ambiente ecc.).

**Materiali e metodi.** L'indagine contempla interviste, campionamento di materiale biologico umano, ambientale e alimentare, con eventuale caratterizzazione genetica dei ceppi isolati sia dai reperti biologici umani che dagli altri campioni. È previsto l'impiego di schede, di altri strumenti per raccolta dati e di software informatici per analisi statistico-epidemiologiche.

**Riassunto.** È stato prodotto, da operatori delle Aree Dipartimentali di Epidemiologia e Prevenzione e Veterinaria della ex-ASL NA2, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno di Portici e della Cattedra di Igiene ed Epidemiologia dell'Università Parthenope, un protocollo operativo che, coinvolgendo tutte le professionalità consenta di superare le difficoltà, ottimizzare le risorse e raggiungere gli obiettivi prefissati.

**Conclusioni.** La collaborazione di diverse figure professionali permetterà, scambi continui di informazioni, finalizzate alla identificazione causa-effetto nella sorveglianza delle MTA; un siffatto modello, inoltre, creerebbe le basi per l'istituzione di una banca dati relativa ai ceppi isolati dalle diverse matrici.

## **P6 ISOLAMENTO DI SALMONELLA SENFTEMBERG DA CARCASSE DI BOVINI REGOLARMENTE MACELLATI**

Francesco Casalnuovo, Rosanna Musarella, Carolina L. D'Argento, Paola Rippa, Vincenzo Cannistrà, Monica Corea, Caterina Rivero  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione Diagnostica, Catanzaro*

**Introduzione.** È stato condotto uno studio articolato su più fasi e finalizzato alla valutazione del rischio di contaminazione microbica delle superfici delle carcasse bovine di animali regolarmente macellati. La prima fase ha riguardato la ricerca di alcuni tra i microrganismi di natura batterica maggiormente implicati in episodi di tossinfezione alimentare nell'uomo, quali *Salmonella spp.*, *E. coli* O157, *Campylobacter spp.* e *Yersinia enterocolitica*. I prelievi sono stati effettuati presso sette diversi stabilimenti di macellazione del territorio, di cui quattro a capacità CE e quattro a capacità limitata. La definizione del rischio di contaminazione era collegato alla valutazione dei livelli igienico sanitari della linea di macellazione bovina ed alla ricerca di tipo qualitativo verso alcune specie batteriche in grado di provocare tossinfezione di origine alimentare nell'uomo. Nel corso dell'indagine è stata isolata in due diverse circostanze *Salmonella* Senftenberg, notoriamente in grado di provocare tossinfezioni alimentari ma la cui presenza non era finora stata segnalata nelle carni bovine.

**Metodi.** È stato applicato il metodo di campionamento non distruttivo previsto dalla Decisione CE 471/2001, che prevede l'utilizzo di tamponi sterili precedentemente inumiditi in soluzione acquosa sterile e successivamente strisciati su un'area di almeno 100 cm<sup>2</sup> per ognuno dei quattro punti di prelievo per ogni carcassa (spalle e facce laterali delle cosce). In totale sono stati eseguiti 500 tamponi superficiali sulle carcasse di 115 vitelloni da carne, di cui 65 di provenienza in vita comunitaria e 50 di provenienza in vita nazionale.

**Risultati.** Interessante da segnalare è l'isolamento da due carcasse di differenza provenienza (una comunitaria e l'altra nazionale) macellate in due diversi stabilimenti CE, di due ceppi di *Salmonella* Senftenberg, mentre nessun isolamento è stato ottenuto per *E. coli* O157, *Yersinia spp.* e *Campylobacter spp.* I dati riguardo all'isolamento di batteri del genere *Salmonella* sulle carni bovine sono in linea con l'incidenza registrata in ambito europeo (1,7%).

**Conclusioni.** Il sierotipo di *Salmonella* Senftenberg è stato più volte chiamato in causa in episodi di tossinfezione alimentare collegati all'utilizzo di erbe aromatiche, soprattutto basilico, nelle preparazioni alimentari. Ulteriori isolamenti sono stati ottenuti su altri vegetali quali menta e prezzemolo, ma anche su carni di pollo. Mentre i vari tipi di *Salmonella* sono inattivati dall'esposizione per 10-15 secondi alla temperatura di 56°C, per *S. Senftenberg* sono stati segnalati dei ceppi dotati di una maggiore termoresistenza e questo potrebbe rappresentare una caratteristica in grado di conferire al sierotipo un ulteriore elemento di pericolosità nell'insorgenza degli episodi tossinfettivi di origine alimentare.

## **P7 ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA ALIMENTI READY TO EAT**

Antonella Costa, Cinzia Cardamone, Vincenzina Alio, Anna Maria Di Noto  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo*

**Introduzione.** È nota l'associazione tra casi epidemici di listeriosi umana e consumo di alimenti contaminati da *Listeria monocytogenes*: in particolare già da qualche anno, organismi di controllo internazionali, quali la FAO e il WHO, hanno messo in evidenza, tra le varie combinazioni patogeno-alimento, il rischio microbiologico legato al consumo di cibi pronti, cosiddetti *Ready To Eat* (RTE). La maggior parte delle listerie di isolamento alimentare, ambientale e clinico è verosimilmente sensibile ai comuni antibiotici impiegati nei confronti dei Gram positivi ma sempre più frequentemente, negli ultimi anni, viene segnalato l'isolamento di ceppi resistenti e/o multi resistenti. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'antibiotico-resistenza in ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti RTE.

**Metodi.** L'indagine è stata condotta su 33 ceppi di *L. monocytogenes* (11 da salmone affumicato, 1 da tonno affumicato, 2 da carpaccio di pesce spada, 2 da carpaccio di tonno, 12 da prodotti lattiero-caseari, 1 da salame, 2 da insalate e 2 da preparazioni gastronomiche cotte) isolati nel periodo 2005-aprile 2009. La ricerca di *L. monocytogenes* è stata condotta secondo la procedura ISO 11290-1:1996/Adm1:2004 seguita da prove di conferma, da prove biochimiche in micrometodo (API Listeria-Biomerieux) e conferma sierologica con l'antisiero *Listeria* O polivalente e gli antisieri specifici (Difco). La sensibilità è stata valutata *in vitro* mediante metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer) in accordo alle linee guida del CLSI, saggiando le seguenti molecole: amoxicillina-ac.clavulanico, ampicillina, cefalotina, clindamicina, cloramfenicolo, eritromicina, flumechina, fosfomicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, neomicina, penicillina, spiramicina, streptomina, sulfametoxazolo-trimethoprim, tetraciclina, tobramicina, vancomicina, oxacillina. Ai fini dello studio, è stato definito "multiresistente" un ceppo che presenta resistenza nei confronti di almeno quattro fra le molecole testate.

**Risultati.** Tutti i ceppi saggiati hanno mostrato sensibilità alla maggior parte degli antibiotici ad eccezione delle resistenze riscontrate per clindamicina (54,4%), flumechina (100%), fosfomicina (81,8%), lincomicina (94%) e oxacillina (63,6%). Sono risultati multiresistenti i ceppi isolati da prodotti ittici affumicati.

**Conclusioni.** Il *pattern* di resistenza da noi osservato viene riportato da altri autori in ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti, dall'ambiente nonché in isolati da pazienti con listeriosi sistemica. Riteniamo importante effettuare una continua sorveglianza di questo patogeno per monitorare l'efficacia degli antibiotici utilizzati, tenuto conto anche della possibilità che i determinanti genici responsabili della resistenza possano essere trasferiti alla *L. monocytogenes* da altre specie batteriche con possibili ripercussioni sul trattamento terapeutico.

## **P8** DIFFUSIONE DI *ANISAKIS SP.* IN TELEOSTEI DELLA REGIONE SICILIA E VALUTAZIONE DEL POTENZIALE ZOOTONICO

Antonella Costa, Anna Maria Di Noto, Aldo Migliazzo, Paola Palumbo, Santo Caracappa  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo*

**Introduzione.** Forme larvali di nematodi anisakidi sono state documentate nei visceri e nella muscolatura di numerose specie ittiche marine di importanza commerciale nei mari italiani: del genere *Anisakis* è nota l'importanza come agente di zoonosi. L'uomo può infestarsi accidentalmente consumando pesci e/o cefalopodi parassitati, crudi o poco cotti o sottoposti a trattamenti quali la salagione, l'affumicatura o la marinatura che non siano stati idonei a uccidere le larve. L'anisakiasi umana, con i noti sintomi gastrointestinali, è ben documentata da diversi autori nell'Italia centro-meridionale compresa la Sicilia. Obiettivo della presente indagine è stato quello di valutare la diffusione di larve di *Anisakis* in prodotti della pesca provenienti dalle zone costiere della Sicilia, concentrando l'attenzione sulle specie ittiche più a rischio di infestazione.

**Metodi.** 335 teleostei freschi, spatole, naselli, sgombri, suri e alici (gennaio 2007-luglio 2009) sono stati esaminati visivamente per la ricerca di *Anisakis*. Sono state calcolate la Prevalenza (P), l'Intensità media (Im) e l'Abbondanza (A), in relazione a specie e taglia del pesce parassitato. È stata inoltre valutata la migrazione delle larve infestanti dai visceri alla parte muscolare del pesce dopo 24 ore dalla cattura.

**Risultati.** Nel 28,1% (94/335) dei pesci esaminati è stata riscontrata la presenza di larve vive appartenenti al genere *Anisakis*. Le prevalenze di infestazione (P) sono risultate variabili con valori più alti nelle spatole (100%) e nei suri (74,5%), seguiti dagli sgombri (43,3%) e dai naselli (24,0%). La P osservata nelle alici è stata dell'1,7%. I suri di taglia superiore ai 25 cm, in particolare, sono risultati significativamente più parassitati: dividendo questa specie ittica in categorie si è calcolata una P del 38,8%, Im 2,6 e A 1,0 per i pesci inferiori a 25 cm e una P del 85,7%, Im 31,1 e A 26,7 tra 25 e 30 cm; la P è stata del 100% nei soggetti con taglia >30 cm. La migrazione delle larve dai visceri al muscolo è stata osservata nel 14,6% dei suri, nel 30,8% delle spatole e nel 15,3% degli sgombri.

**Conclusioni.** Il rischio di presenza di *Anisakis* nei prodotti ittici è da tempo conosciuto ed evidenziato anche dalle attuali normative europee: negli ultimi anni inoltre sono sempre più apprezzate dai consumatori le preparazioni a base di pesce crudo. Lo strumento sul quale l'analisi del rischio, introdotta dal Reg. CE 178/2002, si basa è l'attivazione di adeguati piani di sorveglianza epidemiologica basati sulla raccolta e documentazione di dati.

# COMPORTAMENTO DI MICRORGANISMI PATOGENI NEL SALAME PIACENTINO DOP ARTIFICIALMENTE CONTAMINATO

Federica De Berardinis, Paolo Daminelli, Guido Finazzi, Renato Bertolassi, Emanuela Bonometti, Paolo Boni

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

**Introduzione.** Il Salame Piacentino DOP è un salume tradizionale ottenuto dalla fermentazione lattica di carne suina trita. Secondo quanto prescritto dai recenti regolamenti (Reg. 2073/2005/CE e Reg. 1441/2007/CE) il produttore ha la responsabilità di fornire elementi utili a prevedere il comportamento di microrganismi potenzialmente patogeni che accidentalmente potrebbero venire in contatto con il prodotto. Per tale motivo è stato allestito un *challenge test*, al fine di verificare se il normale processo di produzione e di stagionatura del prodotto sia in grado di contrastare efficacemente *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium ed *E. coli* O157:H7.

**Metodi.** L'impasto del salame è stato suddiviso in cinque aliquote opportunamente identificate: una utilizzata come controllo negativo, tre contaminate con una miscela di ceppi di ognuno dei 3 patogeni, e una contaminata con *L. monocytogenes* e addizionata con un innesto di *S. Carnosus*. Dopo insacco e legatura i salami sono stati sottoposti ad asciugatura e stagionatura protratta fino a 90 giorni. Oltre che sull'impasto ( $t_0$ ) per verificare il livello di contaminazione iniziale sono stati effettuati 9 campioni durante le fasi di stagionatura per valutare l'andamento dei patogeni, dei lattobacilli mesofili, e le variazioni del pH e dell'Aw.

**Risultati.** I Lattobacilli mesofili rappresentano la microflora dominante, hanno uno sviluppo rapido durante l'asciugatura raggiungendo un valore di *plateau* pari a 9 log UFC/g sia nel salame controllo che in quelli contaminati. Sia nel lotto contaminato con *Salmonella* Typhimurium che in quello con *E. coli* O157:H7 si evidenzia un graduale e lineare decremento dei patogeni pari a circa 4 logaritmi dopo 60 giorni, che diventano 5-6 prolungando la stagionatura di un ulteriore mese. In entrambi i lotti di salame contaminati con *Listeria monocytogenes*, con e senza l'aggiunta dell'innesto, non si osserva una diminuzione significativa del patogeno. Dopo 90 giorni la riduzione è quantificabile in meno di 1 valore logaritmico.

**Discussione.** Si può affermare che il normale processo tecnologico di stagionatura del Salame Piacentino DOP è in grado di contrastare efficacemente *Salmonella* Typhimurium ed *E. coli* O157:H7, mentre *L. monocytogenes* si mantiene ad una concentrazione molto vicina a quella di contaminazione. L'aggiunta di popolazioni di *S. Carnosus* non ha dato risultati significativi, tuttavia l'eventuale uso di altre *flore starter* che abbiano un maggiore effetto di competizione sia diretta che indiretta nei confronti di *Listeria*, può essere considerato un valido strumento per diminuire il rischio dato dalla presenza accidentale di tale patogeno.

## PREVALENZA E GENOTIPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CARCASSE E SEZIONATI DI CONIGLIO

Alessandra De Cesare (a), Renzo Mioni (b), Loretta Gallochio (b), Gerardo Manfreda (a)  
(a) *Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi Alma Mater Studiorum, Bologna*  
(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova*

**Introduzione.** I dati relativi ai rischi microbiologici associati alla carne di coniglio sono scarsi. Poiché *Listeria monocytogenes* rappresenta un patogeno rilevante nei prodotti a base di carne, in questo studio si è valutata la sua prevalenza in carcasse e sezionati di coniglio come pure in campioni ambientali raccolti in diversi macelli. I ceppi isolati dalla carne e dall'ambiente sono stati ribotipizzati per valutarne la distribuzione nei diversi impianti e classi di prodotti investigati. Infine, la loro classificazione in una delle linee di patogenicità note per *L. monocytogenes* è stata predetta attraverso il DUP-ID ed il confronto con ceppi disponibili nel *PathogenTracker*.

**Metodi.** La prevalenza di *L. monocytogenes* è stata valutata in 411 carcasse, 246 sezionati e 542 campioni ambientali raccolti in tre macelli dal novembre 2005 a dicembre 2006. L'analisi qualitativa di *L. monocytogenes* è stata eseguita mediante metodica ISO 11290-1. Un totale di 138 isolati (uno da ogni campione positivo) sono stati sottoposti a ribotipizzazione automatica mediante *RiboPrinter*® utilizzando EcoRI.

**Risultati.** La prevalenza di *L. monocytogenes* nei campioni testati è stata dell'11,5%. I sezionati di coniglio sono risultati significativamente più contaminati delle carcasse e dei siti ambientali (34,6 vs 9,7 e 2,4%). La prevalenza del patogeno nei tre macelli era significativamente diversa (20,8, 6,6, 11%). I ceppi ribotipizzati sono stati classificati in sette diversi ribotipi, tre dei quali associati al 95,6% degli isolati. La distribuzione dei ribotipi prevalenti nei tre macelli è risultata significativamente diversa. Tutti i profili di ribotipizzazione identificati in questo studio sono disponibili nel *PathogenTracker* ([www.pathogentracker.net](http://www.pathogentracker.net)) ed i codici di accesso sono FSL 485-006 fino a 485-012.

**Conclusioni.** La maggiore prevalenza di *L. monocytogenes* nei sezionati rispetto alle carcasse ed ai siti ambientali sembra suggerire un aumento della contaminazione durante il ciclo produttivo, forse legato alla presenza di fonti di contaminazione persistenti. Queste ultime erano verosimilmente differenti nei tre macelli colonizzati da isolati con ribotipi diversi. I DUP-IDs associati agli isolati ribotipizzati e la similarità fra i loro profili di ribotipizzazione e quelli disponibili nel *PathogenTracker* ha indicato che il 26,1% degli isolati appartenevano alla I linea di patogenicità, mentre il 73,2% alla II linea. La maggioranza dei ceppi classificati nella I linea sono stati isolati nel macello con la minore prevalenza di *L. monocytogenes*. Questo risultato suggerisce che i dati di analisi genotipica dovrebbero integrare i dati microbiologici di prevalenza per migliorare la valutazione del rischio di *L. monocytogenes* associata al consumo di carne di coniglio.

## **P9** COMPORTAMENTO DI MICRORGANISMI PATOGENI NELLA LAVORAZIONE E STAGIONATURA DEL FORMAGGIO BAGÒSS

Valentina De Nadai, Guido Finazzi, Paolo Daminelli, Renato Bertolassi, Paolo Boni  
*Reparto di Microbiologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

**Introduzione.** La valorizzazione dei prodotti tradizionali italiani e la possibilità di estendere la loro commercializzazione al mercato internazionale è subordinata alla necessità che i produttori forniscano garanzie scientificamente sostenibili a tutela del consumatore in merito alla sicurezza degli alimenti. A tal scopo è stato allestito un *challenge test* per valutare il comportamento dei microrganismi *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 e *Staph. aureus* durante la trasformazione e stagionatura del Bagòss, formaggio a latte crudo e lunga stagionatura tipico della zona di Bagolino (Provincia di Brescia).

**Metodi.** Una miscela costituita da 3 diversi ceppi per ciascuno dei microrganismi patogeni considerati è stata aggiunta al latte crudo prima della trasformazione in formaggio effettuata presso il Laboratorio di Trasformazioni Alimentari del Reparto di Microbiologia dell'IZSLER. Sono stati eseguiti prelievi sul latte immediatamente dopo la contaminazione e durante tutte le fasi di lavorazione e stagionatura del prodotto. Su ciascun campione sono stati effettuati determinazione di pH, Aw e numerazione delle flore lattiche e dei patogeni artificialmente addizionati.

**Risultati.** Durante tutto il processo di produzione e stagionatura del Bagòss si evidenzia la presenza di elevate concentrazioni di flore lattiche, popolazioni in grado di provocare un abbassamento del pH della matrice alimentare e di esercitare un'azione di competizione nei confronti dei microrganismi patogeni. I valori relativi all'attività dell'acqua dimostrano una graduale diminuzione durante tutto il periodo di stagionatura. La combinazione di tali fattori determina l'eliminazione di *Salmonella*, *E. coli* e *Stafilococchi* e il decremento di 4-5 log della concentrazione di *Listeria* nel corso della stagionatura, che prevede durata minima pari a 12 mesi secondo la metodologia tradizionale.

**Conclusioni.** I dati sperimentali ottenuti analizzando il comportamento dei patogeni artificialmente aggiunti al latte prima della lavorazione permettono di conoscere l'andamento di tali microrganismi nel caso di ipotetiche contaminazioni naturali. Le fasi di cottura della cagliata e successivo riposo sotto siero non sono risultate sufficienti a determinare una riduzione significativa della concentrazione dei patogeni considerati. È invece la stagionatura che grazie all'azione combinata di cambiamenti dello stato chimico-fisico del prodotto associati alla presenza di elevate concentrazioni di flore lattiche assicura il loro abbattimento. La metodologia tradizionale di produzione del Bagòss si può pertanto considerare idonea a garantire la sicurezza di tale prodotto nel caso di eventuali contaminazioni da parte dei più comuni microrganismi patogeni coinvolti in episodi di tossinfezioni alimentari.

## **P10 SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO REAL-TIME PCR PER LA DETERMINAZIONE DELLA SALMONELLA NEI PRODOTTI CARNEI**

Elisabetta Delibato (a), Emma Filetici (b), Simona Bifulchi (a), Bruna Auricchio (a), Fabrizio Anniballi (a), Slawomir Owczarek (b), Ida Luzzi (b), Dario De Medici (a), Laura Toti (a)

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

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

Nonostante gli sforzi sostenuti dalle autorità sanitarie e dal mondo industriale, la contaminazione degli alimenti di origine animale da parte dei microrganismi patogeni come *Salmonella* è una eventualità che appare frequentemente e che può aver luogo in ognuna delle fasi della filiera produttiva. L'ampliamento delle conoscenze sui fattori che condizionano la crescita di questo patogeno, nonché sullo sviluppo di metodologie innovative per la loro identificazione e rintracciabilità, ha costituito una premessa di base per lo sviluppo di strategie di prevenzione come previsto dal Regolamento CE 2160/2003 sul controllo delle zoonosi che ha incluso la *Salmonella* tra le attività obbligatorie dei vari Stati Membri. Inoltre il Regolamento 2073/05 CE, oggi integrato dalla 1441/07, ha fissato i criteri microbiologici che definiscono l'accettabilità dei processi produttivi e i parametri microbiologici di sicurezza dei prodotti alimentari. In particolare, per quanto concerne la *Salmonella* descrive in modo dettagliato le categorie, il campionamento ed i limiti, fissando l'assenza di tale patogeno in 25 o 10 g di prodotto a seconda della categoria alimentare da sottoporre ad analisi. Inoltre riporta il metodo analitico (*Salmonella*, ISO 6579) da utilizzare per svolgere le analisi e nell'articolo 5 fa riferimento alla possibilità di avvalersi di metodi alternativi purché validati in base al protocollo definito dalla EN/ISO 16140. La ISO 6579 per la ricerca della *Salmonella* è un metodo affidabile, ma richiede diversi giorni per l'identificazione biochimica e sierologica; per tale motivo è generalmente sentita la necessità di disporre di metodiche rapide che possano condurre alla risposta nel tempo più breve possibile. A tale scopo, nel presente lavoro è stato sviluppato e validato un metodo di *real-time* PCR per la determinazione della *Salmonella* nei prodotti carnei, seguendo le indicazioni della EN/ISO 16140. Sono stati analizzati differenti campioni di bovino, suino, pollo e tacchino, sperimentalmente e naturalmente contaminati utilizzando la ISO 6579, il metodo *real-time* PCR ed un nuovo metodo microbiologico rapido *Salmonella* Precis<sup>TM</sup>. I risultati ottenuti con i metodi PCR *real-time* e *Salmonella* Precis<sup>TM</sup> hanno mostrato una concordanza del 100% rispetto al metodo di riferimento ISO 6579. Tali metodi, che presentano il vantaggio di poter fornire i risultati nell'arco delle 24 (*real-time* PCR) e 48 ore (*Salmonella* Precis<sup>TM</sup>), potranno essere utilizzati sia nell'ambito del controllo ufficiale che nell'ambito di un sistema di autocontrollo, consentendo di prendere decisioni tempestive riguardanti il rilascio di lotti di prodotto o la possibilità del loro ritiro dal commercio.

## **P11 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI VIRALI RESPONSABILI DELL'EPIDEMIA DI GASTROENTERITE SUL LAGO DI GARDA**

Ilaria Di Bartolo (a), Marina Monini (a), Enrico Pavoni (b), Marina Nadia Losio (b), Franco Maria Ruggeri (a)

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

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

Nell'estate del 2009, il grave inquinamento dell'acquedotto di San Felice del Benaco ha causato una devastante Epidemia di Gastroenterite (GE) che ha colpito in pochissimi giorni oltre 2.000 persone e ne ha ospedalizzate oltre 1.000. Questo episodio ha riportato alla luce le problematiche legate alla contaminazione delle acque di superficie con liquami; sempre più rilevanti poiché sempre più spesso vengono utilizzate, previo trattamento, come acque potabili. L'esame batteriologico e virologico di campioni fecali e ambientali eseguito dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia in collaborazione con le Autorità Sanitarie Locali, ha portato all'identificazione di *Campylobacter coli*, *Clostridium perfringens* e diversi virus enterici. L'indagine virologica eseguita presso i laboratori dell'Istituto Superiore di Sanità è stata mirata all'individuazione mediante metodiche di biologia molecolare, di norovirus e rotavirus. A tale scopo sono state effettuate reazioni di *reverse transcription* e *real-time* PCR su campioni di acque provenienti da prelievi effettuati all'interno del lago di Garda e su campioni di feci prelevate da pazienti affetti da GE. L'analisi ha confermato il coinvolgimento di Norovirus e Rotavirus umano. Per una caratterizzazione molecolare dei virus coinvolti, i campioni positivi sono stati sottoposti ad analisi di sequenza. La comparazione delle sequenze con le banche dati dell'NCBI ha evidenziato il coinvolgimento di più ceppi virali. In particolare, nelle feci sono stati identificati 5 diversi genotipi di Norovirus, due dei quali risultavano presenti sia nell'acqua prima della depurazione che nei sedimenti. Anche nel caso dei Rotavirus si è potuto evidenziare la presenza di almeno tre ceppi virali. La positività dei campioni ambientali per Adenovirus umano ha ulteriormente confermato la presenza di contaminazione fecale umana. Per l'elevata infettività dei Norovirus, la loro elevata resistenza nell'ambiente anche per periodi lunghi, è verosimile che diverse vie di trasmissione abbiano contribuito all'espansione dell'epidemia. Inoltre le evidenze ottenute dall'analisi delle sequenze confermano, che la via principale di trasmissione sia dovuta al consumo di acqua contaminata. Per poter valutare anche la presenza di una contaminazione fecale di origine animale, Rotavirus e Norovirus bovino e Adenovirus suino sono stati ricercati nei campioni ambientali. L'esito negativo dell'analisi porta ad escludere una possibile contaminazione animale.

## **P12 RICERCA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTE (MRSA) IN OPERATORI DI INDUSTRIE ALIMENTARI**

Pierluigi Di Ciccio (a), Anna Rita Festino (b), Mauro Conter (a), Domenico Paludi (b), Vincenzo D'Orio (b), Claudia Costanzo (b), Alberto Vergara (b), Adriana Ianieri (a)

(a) *Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi, Parma*

(b) *Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi, Teramo*

**Introduzione.** *Staphylococcus aureus* (*S.a*), responsabile di setticemie e infezioni a carico di cute, apparato respiratorio e tessuti molli, rappresenta anche una delle principali cause di tossinfezione alimentare. Oltre a provocare tossinfezioni, *S.a* è in grado di sviluppare antibiotico-resistenza. La resistenza alla meticillina è una tematica di grande interesse e di estrema attualità. Diversi studi sono finalizzati ad evidenziare il ruolo degli alimenti quali potenziali vettori di *S.a* Meticillino-Resistente (MRSA). La sensibilità alla meticillina viene valutata con metodiche fenotipiche la cui sensibilità e ripetibilità sono legate all'espressione della meticillino-resistenza. Scopo del lavoro è stata la ricerca e l'identificazione di ceppi MRSA isolati da addetti alla lavorazione degli alimenti mediante due metodi fenotipici, di cui uno di recente commercializzazione (Brilliance MRSA - OXOID) e l'altro di routinario utilizzo (MRSA ID - bioMérieux). Gli isolati sono stati sottoposti a PCR per l'identificazione del gene *mecA* ed alla determinazione della MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*).

**Metodi.** Sono stati analizzati 351 campioni prelevati da addetti alla lavorazione. La ricerca di *S.a* è stata condotta secondo la metodica ISO 6888-2, la conferma effettuata mediante identificazione biomolecolare dei geni *rrn* e *nuc*. Gli isolati sono stati saggiati con i terreni cromogeni: Brilliance MRSA (Oxoid) e MRSA ID (bioMérieux). I ceppi sono stati sottoposti a PCR per l'identificazione del gene *mecA* e saggiati per la determinazione della MIC con sistema Vitek (bioMérieux).

**Risultati.** Dei 351 campioni analizzati il 19,94% (n. 70) è risultato positivo per *S.a*. L'utilizzazione del terreno Brilliance MRSA (Oxoid) ha evidenziato 4/70 ceppi positivi (5,71%); l'utilizzazione del terreno MRSA ID (bioMérieux) ha evidenziato 2/70 ceppi positivi (2,85%) di cui 1 *mecA* positivo. I dati relativi alla MIC hanno evidenziato che tutti i ceppi erano sensibili alla oxacillina.

**Conclusioni.** Il dato relativo agli isolamenti dalle maestranze conferma l'importante ruolo che queste rivestono nella contaminazione degli alimenti. Sia il terreno di nuova concezione (Brilliance MRSA-OXOID) sia quello di comune utilizzo (MRSA ID - bioMérieux) non danno garanzie per l'identificazione di ceppi MRSA. I Ceppi positivi al gene *mecA* dovrebbero essere considerati MRSA. I Ceppi negativi alla ricerca del gene *mecA* dovrebbero essere considerati MSSA (*S.a* meticillino-sensibile) solo se alla determinazione della MIC presentano valori  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  mentre MRSA se tali valori sono  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ . L'identificazione del gene *mecA*, in combinazione con la determinazione della MIC, sono le uniche tecniche in grado di fornire dati attendibili sulla meticillino-resistenza (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*).

## **P13** CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA* SIEROTIPO *INFANTIS* MULTIRESISTENTI ISOLATI NELLA REGIONE MARCHE

Anna Maria Dionisi (a), Monica Staffolani (b), Maria Beatrice Valli (c), Stefano Fisichella (b),  
Claudia Lucarelli (a), Slawomir Owczarek (a), Ida Luzzi (a)

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

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

(c) *Istituto Nazionale Malattie Infettive L. Spallanzani, Roma*

**Introduzione.** In Italia, dal 2004, *S. Infantis* rappresenta il 4° sierotipo isolato nell'uomo. Caratteristica di questo sierotipo è sempre stata l'elevata sensibilità agli antibiotici, tuttavia negli ultimi anni sono in aumento ceppi multiresistenti. Nelle Marche, dove la prevalenza di *S. Infantis* è risultata sempre al di sotto della media nazionale sia in campo umano che veterinario, tra luglio 2005 e marzo 2006, è stato registrato un aumento di isolamenti di *S. Infantis* multiresistenti. In particolare, il profilo di resistenza ACSSuT (ampicillina, cloramfenicolo, streptomina, sulfonamidi, tetraciclina) accompagnato spesso da resistenza a Km e Sxt (kanamicina e trimethoprim/sulfametossazolo), era presente in ceppi di varia origine. Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare *clusters* epidemici tra i ceppi di *S. Infantis* isolati nelle Marche da fonti diverse tra il 2005 e il 2006 e di caratterizzare le cassette geniche responsabili dell'antibiotico resistenza.

**Materiali e metodi.** Sono stati tipizzati con l'Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE) 55 ceppi di *S. Infantis* isolati da uomo, ambiente ed alimenti di origine animale, sia sensibili che multiresistenti. Questi ultimi sono stati testati mediante PCR per la presenza delle seguenti cassette geniche di resistenza: *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA-B-C-G*, *sul2*, *strA-B* ed integroni di classe 1. Esperimenti di coniugazione sono stati condotti su ceppi rappresentativi per localizzare i determinanti di resistenza.

**Risultati.** La PFGE ha evidenziato la presenza di un *cluster* prevalente comprendente ceppi con R-type ACSSuTKmSxt. Questi ceppi presentavano i geni *bla<sub>TEM</sub>*, *tetB*, *strA-B*, *sul2*, che conferiscono resistenza all'ampicillina, alla tetraciclina, alla streptomina e ai sulfonamidi. Inoltre possedevano un integrone di classe 1 (2.2 Kb) contenente le cassette geniche: *folA*, *catB3*, *aadA4*, *sul1* per la resistenza al trimethoprim, cloramfenicolo, streptomina/spectinomicina e sulfonamidi. Esperimenti di coniugazione hanno dimostrato che tutte le resistenze sono portate da un plasmide.

**Conclusioni.** L'analisi molecolare mediante PFGE ed in particolare la caratterizzazione delle cassette geniche di resistenza ha evidenziato la circolazione di un *cluster* di *S. Infantis*, con R-type ACSSuTKmSxt, nel periodo 2005-2006 nella Regione Marche. La presenza di un plasmide portatore di queste resistenze ha facilitato la diffusione di ceppi multiresistenti isolati da ambiente, alimenti e uomo anche attraverso il trasferimento genico orizzontale. L'analisi molecolare ha dimostrato ancora una volta di essere uno strumento epidemiologico utile per lo studio e il monitoraggio delle possibili fonti di infezione per l'uomo.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI MULTIRESISTENTI DI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM E DI *SALMONELLA* 4,[5],12:i:- ISOLATI IN ITALIA DA INFEZIONI UMANE

Anna Maria Dionisi (a), Claudia Lucarelli (a), Caterina Graziani (b), Emma Filetici (a), Slawomir Owczarek (a), Ildo Benedetti (a), Sergio Arena (a), Alfredo Caprioli (b), Ida Luzzi (a)  
(a) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Introduzione.** *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium (STM) rappresenta la principale causa di gastroenterite nell'uomo in Italia, con la maggior parte degli isolati multiresistenti. Fino al 2000 il principale *pattern* di resistenza (R-type) comprendeva Ampicillina (A), Cloramfenicolo (C), Streptomina (S), Sulfamidici (Su) e Tetraciclina (T) (ACSSuT). Recentemente è emerso un nuovo R-type ASSuT, mancante della resistenza a C, sia tra ceppi STM che nella variante monofasica, mancante del gene *fljB* per la seconda fase flagellare, *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- (*S.* 4,[5],12:i:-). Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficienza della tipizzazione sierologica e la relazione clonale tra ceppi di STM e *S.* 4,[5],12:i:- con R-type ASSuT e ACSSuT isolati in Italia da infezioni umane tra il 2003 e il 2006.

**Materiali e metodi.** 553 ceppi di STM e *S.* 4,[5],12:i:- con R-type ACSSuT e ASSuT sono stati testati per la presenza del *fljB* mediante PCR ed analizzati mediante Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE) in accordo con il protocollo *PulseNet-Europe*. A ciascun profilo di restrizione è stata assegnata una codifica secondo la nomenclatura internazionale mediante il software Bionumerics. Parte dei ceppi è stata fagotipizzata.

**Risultati.** Per i ceppi con R-type ACSSuT la sierologia e la PCR hanno dato risultati concordi. Per i ceppi con R-type ASSuT, le due tecniche erano discordanti: il 37% dei ceppi sierologicamente definiti STM era negativo per la presenza del *fljB*, invece il 13% dei ceppi sierologicamente definiti monofasici erano positivi. In tutti i ceppi con R-type ASSuT, il profilo di PFGE predominante era STYMXB.0079 (53% e 73,0% rispettivamente); i ceppi STM con R-type ACSSuT appartenevano prevalentemente al profilo STYMXB.0061 (37,2% dei ceppi) e STYMXB.0067 (29,9% dei ceppi). La *cluster analysis* ha evidenziato che più del 90% dei ceppi con R-type ASSuT e ACSSuT, sia STM che *S.* 4,[5],12:i:-, appartengono a due distinti *clusters*. La fagotipizzazione mostrava che il 23% dei ceppi STM con R-type ASSuT non era tipizzabile, mentre il 23% era U302. Percentuali simili erano riscontrate tra i ceppi *S.* 4,[5],12:i:- con R-type ASSuT. Al contrario il 70,2% dei ceppi STM con R-type ACSSuT erano DT104 ma nessun ceppo *S.* 4,[5],12:i:- apparteneva a questo fagotipo.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti confermano la difficoltà nella tipizzazione sierologica di *S.* 4,[5],12:i:- ed evidenziano la necessità di utilizzare metodi molecolari per una corretta tipizzazione. Il nostro studio ha dimostrato che i ceppi con R-type ASSuT, sia STM che *S.* 4,[5],12:i:-, appartengono ad una stessa linea clonale differente da quella dei ceppi ACSSuT.

## PROBLEMI MICROBIOLOGICI LEGATI AL CONSUMO DEI PRODOTTI DI ORIGINE VEGETALE

Giancarlo Durante (a), Paola Picotto (b), Raffaello Lena (b), Laura Toti (c), Elisabetta Delibato (c), Simona Di Pasquale (c), Dario De Medici (c), Federico Capuano (d), Vincenzo Caligiuri (d), Renzo Mioni (e), Francesca Anna Aulicino (f), Laura Mancini (f), Raffaele Scenati (f), Maria De Giusti (g), Ida Luzzi (h)

(a) *Dipartimento di Prevenzione, ASL Salerno (SIAN ex ASL SA2), Salerno*

(b) *Direzione Generale degli Alimenti e della Nutrizione, Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali, Roma*

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

(d) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli*

(e) *Struttura Complessa SCI Microbiologia Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova*

(f) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(g) *Sezione di Medicina Clinica e Sanità Pubblica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma Sapienza, Roma*

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

Le modalità, il numero di persone coinvolte e gli alimenti implicati nelle tossinfezioni alimentari si sono evoluti nel tempo e le cause di infezione vanno ricercate non solo negli alimenti di origine animale ma anche in altre categorie alimentari, come frutta e verdura, sottovalutate fino a poco tempo fa come probabili veicoli di infezione. Le principali fonti di contaminazione e diffusione dei batteri patogeni nei prodotti vegetali possono essere rappresentate dall'acqua utilizzata per irrigare e per tutti i trattamenti cui sono sottoposti i prodotti, dal suolo, dai concimi, dai cambiamenti nelle tecniche di produzione e di confezionamento, dalle contaminazioni crociate e dal personale.

Nonostante gli sforzi sostenuti dalle autorità sanitarie e dal mondo industriale, la contaminazione dei vegetali da parte dei microrganismi patogeni come *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.* e virus enterici è una eventualità che appare quasi inevitabile e che può aver luogo in ognuna delle fasi della filiera produttiva. L'ampliamento delle conoscenze sui fattori che condizionano la crescita di tali microrganismi patogeni, nonché sullo sviluppo di strategie innovative per la loro rapida identificazione e rintracciabilità costituisce una premessa di base per l'attuazione di strategie efficaci di prevenzione e protezione dei prodotti vegetali.

In questi ultimi anni il sistema europeo di allerta RASFF ha più volte richiamato l'attenzione dei Paesi Membri riguardo al pericolo della *Salmonella* in tali prodotti. Per quanto riguarda il nostro Paese, diverse allerta comunitarie, nei periodi 2004-2005 e 2008-2009, hanno riguardato la rucola prodotta in Campania e in alcuni casi, confezionata e commercializzata da alcune aziende site in Veneto. Alcune di queste allerta riguardavano contaminazione da *S. Napoli* in rucola esportata in Svezia dove venivano segnalati anche

casi di tossinfezione da questo sierotipo. L'associazione dei casi con il consumo di rucola importata dall'Italia era dimostrata dai risultati della tipizzazione molecolare mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE) che indicava una omologia genetica dei ceppi isolati dai casi e dai vegetali. Dal momento che *S. Napoli* non viene isolata frequentemente da animali da reddito e che la Regione Campania non partecipa al sistema di sorveglianza Enternet non è stato possibile verificare l'effettiva circolazione di questo sierotipo nella Regione e di conseguenza rintracciare le eventuali fonti di contaminazione.

Per affrontare e risolvere le problematiche relative ai casi d'inquinamento microbiologico nei prodotti orticoli della Piana del Sele, il Ministero della Salute ha istituito un "*Gruppo di lavoro ad hoc sulla problematica della rucola e sistema di allerta RASFF*" (Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Prevenzione della ASL Salerno, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Portici, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Università di Roma Sapienza).

## **P14 CLUSTER DI SALMONELLOSI UMANA NELLA PROVINCIA DI MACERATA**

Anna Duranti (a), Monica Staffolani (a), Rosanna Passatempo (b), Stefano Fisichella (a), Giuseppe Matè (b), Dario Bruè (c), Giorgia Capezzone (d)

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

(b) *Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche, Zona Territoriale, Civitanova Marche, Macerata*

(c) *Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche, Zona Territoriale, Macerata*

(d) *Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche, Zona Territoriale, Fabriano*

Le salmonellosi rappresentano la prima causa di infezione enterica di origine batterica a trasmissione alimentare in Italia e in Europa e *Salmonella* Typhimurium costituisce il sierotipo maggiormente isolato in Italia dal 2001. *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, è una variante del sierotipo Typhimurium ed era originariamente considerata "adattata" alla specie del piccione, nel quale alcuni fagotipi provocano una grave malattia sistemica chiamata "paratifo aviare". Nel 2008 negli archivi regionali del sistema informativo Enter-net il numero di isolamenti dall'uomo di *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen ha subito un brusco aumento a partire dal mese di settembre con un picco nel mese di novembre. Sulla base della caratterizzazione dei ceppi mediante PFGE risultavano dagli archivi 32 casi appartenenti ai pulsotipi STYMXB.0061 o STYMXB.0067 isolati nel periodo settembre-dicembre 2008. Questi pulsotipi erano caratterizzati da una similitudine del 89%. 8 casi risultavano appartenere a 3 cluster di malattia, che avevano coinvolto in totale 24 persone e sui quali erano in corso indagini epidemiologiche da parte del personale dei Dipartimenti di Prevenzione di Macerata e Civitanova Marche. Dalle indagini epidemiologiche effettuate sui focolai dai Servizi di Igiene Pubblica e di Igiene degli Alimenti e Nutrizione si ipotizzava la responsabilità di un salume a bassa stagionatura tipico della Regione (ciauscolo), prodotto da diversi salumifici regionali. Sono stati quindi analizzati numerosi campioni di salumi e la *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen appartenente allo stesso pulsotipo è stata isolata da campioni di salume e da un tampone ambientale di un salumificio locale. Nello stesso periodo sono stati notificati altri 4 casi sporadici di salmonellosi, provocati dalla stessa variante e residenti nei comuni di Recanati e Potenza Picena. Dalle indagini epidemiologiche eseguite, risultava in tre casi il consumo di salumi e in due casi il consumo di ciauscolo. Ulteriori approfondimenti effettuati da parte dei servizi di Igiene degli Alimenti di Origine Animale hanno permesso di verificare che i salumi erano stati consumati a livelli molto bassi di maturazione (14 giorni circa) e che il salumificio adottava metodiche di stagionatura che possono favorire la crescita delle salmonelle. In conclusione la disponibilità di un archivio continuamente aggiornato, che raccoglie gli isolamenti di batteri enteropatogeni dall'uomo e dagli alimenti ha permesso di evidenziare e indagare su un focolaio di tossinfezione che ha coinvolto in totale 60 persone. La stretta collaborazione tra il personale dell'IZS e dei diversi servizi dei Dipartimenti di prevenzione di due zone territoriali ha permesso di individuare la causa di malattia e intervenire per correggere alcune modalità di produzione.

## EPIDEMIA DI TULAREMIA IN TOSCANA COLLEGATA A UNA SORGENTE D'ACQUA NATURALE

Massimo Fabbi (a), Daniela Messeri (b), Nadia Vicari (a), Lidia Marino Merlo (c), Costanza Pierozzi (c), Mariella Talini (c), Giovanni Perelli (d), Wanda Wanderlingh (c)

(a) Centro di Referenza Nazionale per la Tularemia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione Diagnostica, Pavia

(b) Divisione di Malattie Infettive, Ospedale di Pistoia, Pistoia

(c) Dipartimento di Igiene, USL 3, Pistoia

(d) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, USL 3, Pistoia

**Introduzione.** *Francisella tularensis* è l'agente eziologico della tularemia, un agente in grado di causare malattia negli animali e nell'uomo ed inserito nella lista A degli agenti del bioterrorismo. La tularemia fu riconosciuta per la prima volta in Italia nel 1964, in provincia di Pavia, in lepri importate a scopo di ripopolamento dall'Est Europa. Da allora, quasi ogni anno la malattia viene saltuariamente diagnosticata in lepri trovate morte in particolare in Emilia-Romagna e Toscana. Casi sporadici sono segnalati ogni anno anche nell'uomo da contatto con lepri infette o morso di zecca. Tra il 1983 e il 1990 sono stati segnalati in Toscana ed in Liguria due importanti focolai connessi al consumo di acqua proveniente da acquedotti non controllati. Viene qui descritta una epidemia di tularemia verificatasi nella provincia di Pistoia e collegata ad una sorgente d'acqua naturale di montagna.

**Metodi.** Nel periodo aprile 2007 - marzo 2008, sono stati confermati da segni clinici e analisi sierologiche 44 casi di tularemia. La maggior parte dei casi (n=39) si sono verificati tra il dicembre 2007 e marzo 2008. La probabile fonte di infezione è stata individuata nell'acqua sorgiva prelevata da una fontana posta a circa 950 m di altitudine. L'acqua della sorgente veniva solitamente raccolta da residenti e turisti, conservata in contenitori e consumata a casa. I campioni d'acqua sono stati raccolti due volte: il 15 febbraio e il 4 marzo 2008 e testati per *Francisella tularensis* mediante PCR (convenzionale e *real-time*), metodi microbiologici e prova biologica.

**Risultati.** Dei 44 casi confermati, 39 (88%) sono stati esposti ad una fonte d'acqua comune. I segni clinici più frequentemente osservati sono stati una linfadenopatia cervicale talora a carattere suppurativo e, in alcuni casi, tonsillite purulenta. Il titolo anticorpale dei casi confermati variava da 1:50 a 1:1600. *Francisella tularensis* subsp. holarctica (tipo B) è stata dimostrata nell'acqua di sorgente naturale in ambedue i prelievi effettuati mediante PCR e isolamento conseguente a prova biologica nel topo. Non è stato possibile isolare il batterio tramite esame colturale direttamente dall'acqua. Il focolaio è stato controllato smantellando il manufatto di cemento avvolgente la fonte e ripristinando il ruscello naturale.

**Conclusioni.** L'epidemia si è verificata circa 20 anni dopo altri due importanti focolai di Tularemia registrati nel Nord e Centro Italia (Liguria e Toscana) e conferma la circolazione di *Francisella tularensis* in Toscana. Approfondimenti sono in corso e volti ad accertare le modalità di contaminazione della fonte e l'ecosistema che ha consentito la presenza e/o la replicazione di *Francisella tularensis* nel sistema acquatico.

## **LISTERIA MONOCYTOGENES NEL CONTENUTO INTESTINALE DI BOVINI DA MACELLO**

Valerio Giaccone (a), Lorenzo Vercellotti (b), Elena Pavoletti (b), Fabio Chiesa (b), Domenico De Palma (c), Riccardo Miotti Scapin (a), Ioanna Radu (a), Giampaolo Colavita (d)

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

(b) *Servizio Veterinario, ASL VC, Vercelli*

(c) *Azienda ULSS 15 Alta Padovana, Padova*

(d) *Università degli Studi del Molise, Campobasso*

**Introduzione.** I prodotti a base di carne RTE (*Ready to eat*) sono un'importante causa di listeriosi umana. In Inghilterra e Galles tra il 1996 e il 2000 si sono registrati 221 casi di malattia, con 78 decessi; nell'agosto 2008, in Canada si sono avuti 56 casi di listeriosi con 20 morti per consumo di prodotti carni RTE crudi e cotti. *Listeria monocytogenes* è un batterio ampiamente diffuso nell'ambiente e inquina un'ampia gamma di alimenti, di origine sia animale che vegetale. Ciò giustifica il suo frequente isolamento da vari tipi di alimenti per l'uomo. Per le carni, uno dei possibili punti di inquinamento può essere il macello, ma in bibliografia si trovano pochissimi dati sulla prevalenza di portatori asintomatici di *L. monocytogenes* tra gli animali macellati, a fronte di un'ampia messe di dati su *Salmonella enterica*, *Campylobacter* e i ceppi verocitotossici di *E. coli*. Questa ricerca valuta la prevalenza di portatori asintomatici di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale fra i bovini regolarmente macellati nel Nord Italia.

**Metodi.** Si è analizzato il contenuto intestinale di 469 bovini regolarmente macellati in due macelli (200 vacche a fine carriera, 200 vitelloni da carne e 69 vitelli). La ricerca di *L. monocytogenes* è stata condotta con metodica ISO 11290-1. I ceppi sospetti isolati sono stati identificati con le usuali tecniche morfologiche e biochimiche.

**Risultati.** Dai campioni esaminati si sono isolati 34 ceppi di *Listeria spp.* (7,25% del totale), così ripartiti per specie: *L. monocytogenes* 7 ceppi (1,49%), *L. innocua* 10 ceppi (2,13%), *L. grayi* 9 ceppi (1,92%), *L. ivanovii* 4 ceppi (0,85%) e *L. welshimeri* 4 ceppi (0,85%).

**Conclusioni.** Questi sono i primi dati italiani disponibili sulla prevalenza di *L. monocytogenes* nei bovini regolarmente macellati e confermano che questi animali sono portatori asintomatici di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale. I dati da noi riscontrati sono circa il doppio di quanto segnalato nei bovini in Turchia da Kalender (2003); in Spagna, invece, si sono registrate prevalenze molto più alte rispetto alle nostre (21,3%), soprattutto nei bovini da latte per via degli insilati. È necessario approfondire ulteriormente le indagini sia aumentando il numero di capi esaminati sia valutando come allevamento e tipo di alimentazione possono influire su tali valori di prevalenza. Si conferma che il contenuto intestinale dei bovini macellati può costituire una fonte di inquinamento da *L. monocytogenes* e altre specie di *Listeria* delle carni fresche e dei prodotti derivati.

## **P15** CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIE ENTERICA* SIEROTIPO NAPOLI: SIEROTIPO "RI-EMERGENTE" IN ITALIA

Caterina Graziani (a), Luca Busani (a), Anna Maria Dionisi (b), Alfredo Caprioli (a), Ida Luzzi (b)

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

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

Durante l'ultimo decennio, il sistema di sorveglianza Enter-net, ha registrato un aumento dei casi umani causati da *Salmonella* Napoli in Italia, Francia e Svizzera. Questo sierotipo è raramente isolato da animali e alimenti d'origine animale, mentre è di frequente riscontro in campioni ambientali. Fino ad oggi, poco è noto su questo sierotipo e tenendo conto dell'aumento degli isolamenti è importante studiarne le caratteristiche, al fine di ottenere informazioni sulle potenziali fonti di esposizione per l'uomo. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare una collezione di ceppi di *S. Napoli* isolati in Italia, tra il 2000 e il 2005, attraverso lo studio dei geni di virulenza e la valutazione della loro correlazione genetica. 44 ceppi isolati dall'uomo, da animali, da alimenti d'origine animale e dall'ambiente appartenenti ad una collezione presente presso l'Istituto Superiore di Sanità sono stati esaminati mediante PCR per evidenziare la presenza di geni di virulenza (*avrA*, *spvC*, *gipA*, *sodCI*, *ssaQ*, *sopB*, *mgtC*, *bcfC*, *sopE1*, *spi\_4D*). La correlazione genetica è stata determinata attraverso l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) in accordo con il protocollo Pulse-Net Europe. L'analisi dei risultati ha mostrato che i geni di virulenza riscontrati con maggiore frequenza sono stati *ssaQ*, *sopB*, *mgtC* e *bcfC*. Al contrario, i geni *gipA*, *spvC*, *avrA* e *sodCI* non sono stati riscontrati. Il gene *sopE1* era presente nell'86,4% dei ceppi. In generale, non sono state evidenziate differenze rilevanti tra le frequenze dei geni negli isolati da diversa origine. L'analisi della correlazione genetica ha mostrato 1 *cluster* principale e 5 *cluster* secondari, mentre 8 ceppi non sono risultati correlati (coefficiente di similitudine <80%). Il *cluster* principale include 20 ceppi (6 uomo, 3 animali, e 11 da ambiente). Nove su undici dei ceppi ambientali (4 del 2001 e 5 del 2002) provengono dalla provincia di Varese. In generale non sono state osservate correlazioni tra il profilo di PFGE e il profilo di virulenza. In conclusione dai risultati ottenuti si evince che:

- i ceppi di *S. Napoli* posseggono geni di virulenza paragonabili a quelli dei principali sierotipi coinvolti nelle infezioni enteriche umane;
- vi è una variabilità tra i ceppi ma un clone principale sembra circolare in Italia;
- ad esso appartengono ceppi umani, animali e ambientali, dato che supporta l'ipotesi che l'ambiente possa rappresentare un fattore di rischio per le infezioni da *S. Napoli* nell'uomo.

Ulteriori informazioni sono necessarie per capire meglio l'epidemiologia di questo sierotipo, i suoi possibili *reservoir* e le vie di infezione per l'uomo.

## **P16** APPROCCIO DIAGNOSTICO IN UN'EPIDEMIA DI GASTROENTERITE ACUTA SUL LAGO DI GARDA

Marina Nadia Losio, Antonio Lavazza, Loris G. Alborali, Mariagrazia Zanoni, Enrico Pavoni, Barbara Bertasi, Enrica Moro, Paolo Boni

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

Nel corso dell'estate 2009, a partire dal 9 giugno, nella località turistica di San Felice del Benaco (BS) sono stati registrati i primi casi di sintomatologia gastroenterica (vomito, diarrea e febbre) in 21 soggetti ospiti di una struttura ricettiva. Nel sospetto di una presunta tossinfezione alimentare le Autorità Sanitarie Locali sono intervenute sottoponendo i pazienti agli esami di rito (coprocoltura e tampone faringeo) e gli alimenti alle analisi microbiologiche di *routine*. Tuttavia, nelle giornate successive sono stati registrati progressivamente nuovi casi di analoga sintomatologia anche nella popolazione residente e turistica, fino al raggiungimento di un picco massimo il 21 giugno per un totale di circa 2.000 casi e 26 ricoveri ospedalieri (di cui 18 pediatrici). Nel frattempo, la rapidità e l'elevata diffusione dell'epidemia a tutte le categorie della popolazione hanno fatto presupporre che il mezzo di contaminazione più sospetto fosse l'acqua della rete idrica comunale e che i patogeni implicati fossero di origine virale. Per questo motivo, dopo il sigillo di tutte le fonti di erogazione, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia in collaborazione con le Autorità Sanitarie Locali, ha effettuato le analisi delle feci e dei prelievi di acqua per un totale di 60 e di 251 campioni rispettivamente. I campioni di feci sono stati sottoposti ad indagine batteriologica e virologica. L'esame batteriologico è stato indirizzato verso la ricerca di *Clostridium perfringens*, *Shigella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* e *Prothoteca sp.* Dai 49 campioni esaminati sono stati isolati un *Campylobacter coli* e 17 *Clostridium perfringens*. Le indagini virologiche sono state effettuate con tecnica di microscopia elettronica in colorazione negativa previa ultracentrifugazione con Airfuge Beckman, con metodo ELISA per rotavirus di gruppo A e con PCR e *real-time* PCR. In particolare, i campioni di feci, dopo chiarificazione 1:10 (w/v) in acqua sterile ed estrazione dell'RNA, sono stati sottoposti ad analisi PCR e PCR-*real-time* per la determinazione di Norovirus Genogruppo I (GI) e Genogruppo II (GII), Rotavirus ed Enterovirus. Per ogni prelievo di acqua, 500 ml di volume pretrattati a pH 3,5 con AIC13 0,0005 M, sono stati filtrati con filtri in nitrocellulosa e questi ultimi, dopo eluizione in un *buffer* di eluizione, sono stati sottoposti alle medesime analisi. Fra le coprocolture, 59 campioni sono risultati positivi e, più specificatamente, 25 per Norovirus (13 GI, 4 GII e 8 sia GI che GII), 21 per Rotavirus e 13 per Enterovirus. Fra i campioni di acqua, 6 sono risultati positivi per Norovirus GI ed 1 sia GI che GII, mentre 1 positivo per Enterovirus.

## **P17 PREVALENZA DI GENI QNR TRA CEPPI DI SALMONELLA ENTERICA CON RIDOTTA SUSCETTIBILITÀ ALLA CIPROFLOXACINA ISOLATI IN ITALIA**

Claudia Lucarelli, Anna Maria Dionisi, Laura Villa, Slawomir Owczarek, Ida Luzzi  
*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Introduzione.** La resistenza ai chinoloni è dovuta ad una mutazione puntiforme sul gene codificante per la DNA girasi A; recentemente sono stati descritti diversi meccanismi che riducono l'attività della ciprofloxacina (*qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*) in diverse specie batteriche. I più comuni geni *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) sono stati identificati su plasmidi in *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella spp.* Dal momento che in Italia non erano disponibili informazioni sulla diffusione di questi determinanti genici (*Plasmis-mediated Quinolone Resistance*), lo scopo del lavoro è stato di valutare la presenza di geni che conferiscono ridotta suscettibilità ai fluorochinoloni tra i ceppi di *Salmonella enterica* isolati da infezioni umane e collezionati nell'ambito della sorveglianza Enter-net nel periodo 2003-2006.

**Materiali e metodi.** 1.811 ceppi di *S. enterica*, epidemiologicamente non correlati, collezionati presso l'Istituto Superiore di Sanità sono stati saggiati mediante E-test per determinare la MIC per la ciprofloxacina. Nei ceppi resistenti sono state ricercate le mutazioni responsabili della resistenza mediante PCR e sequenziamento dei frammenti dei geni *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* (QRDR). Sia i ceppi resistenti che con ridotta suscettibilità alla ciprofloxacina (MIC $\geq$ 0,125 $\mu$ g/ml) sono stati testati per PCR per la presenza dei geni *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*. Esperimenti di coniugazione sono stati condotti sui ceppi positivi per geni *PMQR*.

**Risultati.** 89 dei ceppi analizzati mostravano ridotta suscettibilità alla ciprofloxacina, 1 ceppo di *S. Typhimurium* e 2 ceppi di *S. Kentucky* erano resistenti. 85 ceppi erano resistenti all'acido nalidixico. I 3 ceppi resistenti alla ciprofloxacina mostravano le mutazioni nella QRDR già descritte in letteratura. Un ceppo di *S. Typhimurium*, isolato nel 2004 da un caso di gastroenterite, resistente ad ampicillina, cefotaxime, ceftazidime, kanamicina, trimetoprim/sulfametossazolo, con una MIC per la ciprofloxacina di 0,38  $\mu$ g/ml e sensibile all'acido nalidixico, era positivo per il gene *qnrB*, identificato per sequenziamento come una variante del gene *qnrB19* depositato in banca dati. La coniugazione ha dimostrato la presenza di un plasmide portatore del gene *qnr* e dei geni responsabili della resistenza ad ampicillina, cefotaxime, ceftazidime e kanamicina.

**Conclusioni.** Questo studio conferma la bassa frequenza di geni *PMQR* tra i ceppi di *Salmonella enterica* isolati da uomo in Italia. Tuttavia la presenza di un gene *qnr*, in associazione con un gene che conferisce resistenza ai  $\beta$ -lattamici di terza generazione, in un ceppo di *S. Typhimurium*, che rappresenta il sierotipo più frequentemente isolato da casi di gastroenterite in Italia e sierotipo ubiquitario, richiede particolare attenzione per la sua facile diffusione anche tra specie batteriche diverse.

## **P18 GASTROENTERITE VIRALE DA INQUINAMENTO DELL'ACQUEDOTTO PUBBLICO: ANDAMENTO EPIDEMICO E RICHIESTA DI FARMACI**

Camilla Luzzago (a), Maddalena Dé Cillà (b), Stefano De Giuli (c)

(a) *Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi, Milano*

(b) *Medico Veterinario Libero Professionista, San Felice del Benaco, Brescia*

(c) *Farmacista, San Felice del Benaco, Brescia*

Nel giugno 2009 si è verificata un'epidemia di gastroenterite fra gli utenti dell'acquedotto del comune di San Felice del Benaco (Bs). I dati ufficiali, ad oggi disponibili, riportano 299 casi sospetti, verificatisi tra l'8 giugno e il 4 luglio u.s. con un picco il 15-16 giugno. 30 casi sono stati confermati dall'identificazione di almeno uno dei seguenti virus: norovirus, rotavirus, enterovirus o astrovirus; inoltre è stata evidenziata la presenza di batteri: *Salmonella sp.* n=2, *Clostridium perfringens* n=1 e *Campylobacter sp.* n=1. Un'ordinanza comunale del 16 giugno ha vietato l'utilizzo a scopo alimentare dell'acqua del civico acquedotto, revocata il 1 luglio u.s.

Il comune ha una popolazione di 3.360 residenti, con un notevole incremento delle presenze, soprattutto nel periodo estivo, per la prevalente vocazione turistica del territorio. L'indagine riporta l'andamento delle vendite di farmaci sintomatici per forme gastroenteriche, fermenti lattici ed integratori salini, registrate dal sistema informatico dell'unica farmacia del territorio comunale. Il numero di confezioni di farmaci venduto nel mese di giugno 2009 è stato confrontato con quello del bimestre antecedente e successivo all'epidemia, nonché con lo stesso periodo dell'anno precedente.

Le confezioni di prodotti antidiarroici, vendute a giugno 2009 (n=182), rappresentano il 77,8% di quelle complessivamente richieste da aprile ad agosto (n=234); nello stesso periodo del 2008 le vendite sono state di 96 confezioni. Relativamente agli antiemetici, sono state vendute 133 confezioni, pari al 78,2% del periodo di riferimento 2009, contro un totale di 80 per lo stesso periodo del 2008. Anche le vendite dei fermenti hanno registrato un incremento, passando da 77 e 74 confezioni relative ai mesi di aprile e maggio a 789 in giugno, contro le 486 di aprile-agosto 2008. Infine, la richiesta di integratori è stata di 67 confezioni nel mese dell'epidemia, pari al 69% dei cinque mesi considerati; nello stesso periodo del 2008 sono state vendute 25 confezioni.

I dati delle categorie di farmaci rappresentano il quadro dei prodotti utilizzati nel corso dell'epidemia. Pur non potendo verificare l'effettiva corrispondenza fra il loro acquisto ed effettivo utilizzo, va considerato che detti farmaci, senza obbligo di ricetta, erano a carico del paziente. Inoltre il picco di casi clinici si è verificato 24-48 h dopo un fine settimana di notevole afflusso turistico, anche giornaliero, è verosimile quindi che le vendite registrate presso la farmacia risultino sottostimate rispetto alla reale richiesta.

## **P19** DIFFUSIONE DI *CAMPYLOBACTER COLI* IN SCROFE E SUINETTI IN ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO

Chiara Magistrali (a), Alessia Zicavo (a), Giovanni Pezzotti (a), Michele Tentellini (a), Maria Cristina Neri (a), Eleonora Scoccia (a), Carmen Maresca (a), Anna Maria Dionisi (b), Silvia Crotti (a), Stefania Scuota (a)

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

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

Uno studio di coorte è stato effettuato in due allevamenti di scrofe a ciclo chiuso, ed in uno di suinetti figli di scrofe di uno dei due allevamenti, allo scopo di studiare le modalità di diffusione di *Campylobacter coli* negli allevamenti suini a ciclo chiuso. Le scrofe sono state distinte in 3 diverse categorie in base al numero di parti (primipare, pluripare da 1-5 parti, pluripare con più di 5 parti), e in diversi momenti del ciclo riproduttivo (preparto, a 2-5 giorni prima del parto; postparto 1,2-5 giorni dopo il parto, post parto 2, 20 giorni dopo il parto e infine gestazione, 24-31 giorni dopo il parto). I suinetti (n=102), selezionati con campionamento stratificato basato sulla categoria di parto delle madri (primipare, pluripare 2-5 parti e pluripare >5 parti), provenivano da un unico allevamento e sono stati identificati individualmente. I suinetti sono stati campionati durante lo svezzamento subito dopo il loro trasferimento in gabbia (35 giorni di età circa) e quindi dopo la messa a terra nell'allevamento di destinazione (110 giorni di età circa).

Dai campioni di feci prelevati individualmente, è stata effettuata la ricerca selettiva di *Campylobacter spp.* termofili: in breve, è stato effettuato un arricchimento in Preston Broth per 48 h in microaerofilia (CAMPYGEN OXOID) a 41,5°C, semina su Karmali e Preston Agar e coltura per 5 giorni a 42°C in microaerofilia. Le colonie sospette sono state identificate mediante PCR. Ceppi di *Campylobacter coli* appartenenti ai suinetti e alle loro madri sono stati sottoposti a PFGE utilizzando l'enzima di restrizione Sma I. I valori di incidenza di *Campylobacter coli* nelle scrofe sono state di 6,79% in preparto, 6,49% in post parto 1, 7,97% in post parto 2 e 3,92% in gestazione. Le percentuali di esiti diagnostici positivi a seconda del numero di parti sono state per le primipare: 8,1%, pluripare 1-5 parti: 7,1%; pluripare >5 parti: 8,1%. I valori di incidenza relativi ai suinetti sono stati di 13,8% nello svezzamento e 57,4% a 110 giorni.

Non si sono osservate differenze significative di escrezione in scrofe campionate in momenti del ciclo riproduttivo e di numero di parti diverso, anche se in prossimità del parto le percentuali di escrezione appaiono superiori. Per quanto riguarda i suinetti, la percentuale di soggetti positivi è aumentata dopo lo svezzamento, come segnalato da altri autori. La PFGE ha dimostrato una notevole variabilità nei ceppi di *Campylobacter coli* circolanti tra scrofe e suinetti, con la presenza di 29 genotipi distinti su 37 profili analizzati. Solo in un caso è stato possibile dimostrare la presenza di un unico clone da scrofa e prole fino ai 90 giorni di età. Concludendo, l'escrezione di *Campylobacter coli* appare scarsamente influenzata dallo stato del ciclo fisiologico dei riproduttori e dal numero di parti degli

stessi, mentre viene confermata la grande variabilità della popolazione di *Campylobacter coli* anche all'interno di un'unica azienda. Pur essendo stata dimostrata in un caso la presenza di un unico clone da scrofa e prole, questa correlazione non appare diffusa nella popolazione indagata.

## **P20 VERIFICA DEL CONTENUTO DI ISTAMINA NELLA PRODUZIONE DI AGONI SOTT'OLIO DEL LAGO D'ISEO E VALUTAZIONE DELLA DINAMICA *IN VITRO***

Viviana Miraglia, Guido Finazzi, Paolo Daminelli, Paola Monastero, Renato Bertolassi, Silvia Todeschi, Paolo Boni

*Reparto di Microbiologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

**Introduzione.** Nel 2009 è stata effettuata la caratterizzazione di un prodotto tradizionale di origine ittica del lago d'Iseo: gli agoni essiccati sott'olio, per valutarne il potenziale rischio microbiologico per il consumatore. Oltre a vari parametri microbiologici è stata effettuata la ricerca dell'istamina, amina biogena, prodotta dalla decarbossillazione dell'istidina in alcuni pesci tra cui quelli appartenenti alla famiglia dei Clupeidi (sardine, aringhe, cheppie). Mentre una piccola parte di istamina può svilupparsi fisiologicamente nei tessuti muscolari con il diminuire della freschezza, quote rilevanti vengono invece prodotte dalla proliferazione batterica conseguente ad una prolungata permanenza dell'alimento a temperature >6-10°C. La presenza di elevati tassi di istamina, anche in assenza di alterazioni di odore o sapore, può determinare gravi casi di intossicazione alimentare. In questo studio oltre alla valutazione microbiologica del prodotto, si sono voluti isolare alcuni ceppi istamino-produttori per verificarne crescita e produzione di istamina *in vitro*.

**Metodi.** Sui lotti di 5 diversi produttori sono stati eseguiti periodici campionamenti nel corso del processo produttivo: sul pesce fresco, a fine salatura, a fine essiccazione, dopo torchiatura, dopo immersione sott'olio e successivamente a vari intervalli nel prodotto conservato sott'olio fino a tre mesi dall'inizio della produzione. Dai campioni con presenza di istamina in valori elevati è stato isolato un ceppo di *Hafnia alvei*, trasferito in *Tuna Fish Infusion Broth* (TFIB) e incubato a 30°C per 64 giorni, determinando l'istamina e numerando le Enterobacteriaceae con cadenza settimanale ad eccezione dell'ultimo prelievo a distanza di un mese. La ricerca di istamina è stata effettuata con metodo ELISA.

**Risultati.** Su 2 delle 5 diverse produzioni sono stati evidenziati valori di istamina, pari a 568 e 101 ppm, associati ad una concentrazione di Enterobacteriaceae compresa rispettivamente tra 103 e 105 Log UFC/g. I dati relativi la prova *in vitro* mostrano un'iniziale moltiplicazione delle Enterobacteriaceae (*Hafnia alvei*) e successiva riduzione, associata ad un aumento lineare dell'istamina fino a valori di 840 ppm.

**Conclusioni.** È stato possibile dimostrare come i batteri istamino-produttori, ad elevate temperature siano in grado di produrre istamina anche in fase stazionaria o di riduzione batterica. Soltanto la conservazione dei pesci a basse temperature, unitamente ad una corretta conduzione igienica, consente di contenere la produzione di istamina.

## **P21 MALATTIE ALIMENTARI E FARMACI PER LORO TERAPIA: "UNA MODESTA OSSERVAZIONE"**

Giancarlo Nervi (a), Marcello Pittaluga (b), Gaetano Garofalo (a), Alessandro Canepari (c), Donatella Tiberti (a)

*(a) Azienda Sanitaria Locale, Alessandria*

*(b) Presidente Ordine dei Farmacisti della Provincia di Alessandria, Alessandria*

*(c) Azienda Nazionale Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria*

Nelle società evolute occidentali le malattie alimentari sono oggetto di studio scientifico e professionale sempre più approfondito ed interdisciplinare. I dati a nostra disposizione sono sempre più numerosi ma, nonostante questo, le interpretazioni e le analisi non sempre possono ricondurre a considerazioni conclusive significative.

Un esempio è la correlazione di alcuni dati che abbiamo estrapolato dalle attività dell'azienda ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo" di Alessandria, del servizio veterinario dell'ASL AL e dai dati ufficiosi di vendita forniti da un campione di 50 farmacie della Provincia di Alessandria.

L'Azienda Ospedaliera, innanzitutto, non riconosce un codice univoco in ingresso per i sospetti di malattia alimentare: questi infatti vengono associati ad altre intossicazioni quali le iatrogene o da CO<sub>2</sub>. Certamente esiste una apposita scheda epidemiologica per le patologie infettive (quali salmonella ad esempio) da trasmettere al S.I.S.P. ma è indubbio che buona parte delle malattie alimentari resta difficilmente identificabile. I dati a disposizione sono viziati da una caso di intossicazione da CO<sub>2</sub> occorsa in occasione di una funzione religiosa: circa 80 bambini nell'anno 2007.

Per quanto riguarda il Servizio Veterinario, si precisa che vengono ricercati, negli alimenti di origine animale, patogeni trasmissibili all'uomo o produttori di tossine, secondo quanto previsto dai Piani regionali integrati di sicurezza alimentare e che vedono controllati sia la piccola che la grande distribuzione come la ristorazione collettiva pubblica. I dati riguardanti gli ultimi anni di attività rivelano la quasi totale negatività degli esiti.

Ancora, il Servizio Riferimento Regione Piemonte di epidemiologia e malattie infettive ha registrato, negli ultimi cinque anni, solo cinque episodi di tossinfezione alimentare, peraltro in ambito familiare, nel territorio della Provincia di Alessandria.

Resta pertanto interesse quanto riportato circa i volumi di vendita di farmaci utilizzati in caso di malattia alimentare. Certamente, per quanto riguarda l'Imodium può avere un ruolo importante anche la diffusione pubblicitaria come non bisogna dimenticare che il Plasil viene utilizzato anche in caso di terapia con chemioterapici. È indubbio tuttavia che il confronto dei dati sopraccitati (circa cinquemila confezioni di Bimixin/anno) meriti qualche osservazione stante la notevole diffusione di farmaci per la cura di malattie che sembrerebbero non sussistere nelle nostre zone.

Non è una novità che in Piemonte il maggior numero di malattie alimentari sia da ricondurre ad episodi di ristorazione casalinga in ambito familiare tuttavia ci sembra opportuno iniziare a riflettere circa l'opportunità di modificare sia la raccolta dei dati che la

natura dei controlli a favore, magari, di una più attenta e capillare informazione all'igiene degli alimenti ed ad una maggiore precisione nella diagnosi unita ad un dettaglio più significativo nel rapporto prescrizione-segnalazione.

## COMPORTAMENTO DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ENTEROTOSSIGENO IN LATTE VACCINO ADDIZIONATO DI FERMENTI LATTICI

Elisa Oliverio (a), Guido Finazzi (a), Paolo Daminelli (a), Stefania Ducoli (a), Carlo Costanzi (b), Emanuela Bonometti (a)

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

(b) Provincia Autonoma di Trento, Trento

**Introduzione.** Per ottemperare agli obblighi dettati dai regolamenti comunitari è compito dei produttori di documentare la sicurezza alimentare e verificare il comportamento di microrganismi potenzialmente patogeni per il consumatore. A tale scopo è stato valutato se l'aggiunta di fermenti lattici (yogurt) come innesto fosse in grado di inibire la produzione di tossina da parte di *Staphylococcus aureus* nel latte destinato alla caseificazione secondo la tecnologia tipica dei formaggi d'alpeggio dell'Arco Alpino.

**Metodi.** La sperimentazione è stata condotta utilizzando sia latte UHT che latte crudo. Entrambe le tipologie di latte sono state suddivise in 3 aliquote da 200 ml delle quali: una addizionata di *S. aureus* enterotossigeno alla concentrazione di 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> ufc/ml e 10 ml di yogurt; una con solo *S. aureus* e la terza aliquota utilizzata come controllo negativo. Tutti i campioni sono stati conservati a 20°C e campionati dopo 4, 7, 24, 28, 31 e 48 ore. Sui campioni di latte crudo si è proceduto a numerazione di *S. aureus*, numerazione di flora lattica, ricerca dell'enterotossina e determinazione del pH. Le stesse analisi sono state effettuate anche sui campioni di latte UHT unitamente alla numerazione della carica batterica totale mesofila.

**Risultati.** Nel latte UHT contaminato non addizionato di fermenti si è osservato un rapido incremento della popolazione di *S. aureus* con presenza di enterotossina a 28 ore. Nel latte UHT addizionato di flora lattica la concentrazione del patogeno si è mantenuta invariata e non è stata prodotta enterotossina. Nei campioni di latte crudo, con naturale presenza di flore lattiche, indipendentemente dall'ulteriore aggiunta di innesto, la popolazione di *S. aureus* si è mantenuta costante e in entrambe le situazioni non si è avuta la produzione di enterotossina.

**Conclusioni.** L'incremento di *S. aureus*, e la conseguente produzione di enterotossina nel latte crudo è inibito dalla contemporanea presenza di flore lattiche, sia naturalmente presenti sia innestate. L'assenza di flore in grado di biocompetere nei confronti di *S. aureus* consente il rapido aumento del patogeno e la produzione di enterotossina, come si evince nei campioni di latte UHT contaminati. La pratica di aggiungere flora lattica potenziando quella inizialmente presente nel latte rappresenta dunque un metodo per prevenire la moltiplicazione di *S. aureus* e la conseguente produzione di tossina nei formaggi al latte crudo, quali usualmente prodotti in malga.

## INFEZIONI GASTROENTERICHE DA *V. PARAHAEMOLYTICUS* SIEROTIPI O3:K6 E O1:KUT IN ITALIA

Donatella Ottaviani, Francesca Leoni, Cristina Canonico, Stefano Potenziani, Sabrina Santarelli, Laura Masini, Stefania Scuota, Elena Rocchegiani

*Centro di Referenza Nazionale Controllo Microbiologico e Chimico Molluschi Bivalvi Vivi, CEREM, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Ancona*

**Introduzione.** *V. parahaemolyticus* appartenente ai sierotipi O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:KUT (K non tipizzabile) dal 1996 è responsabile di pandemie in Asia, Africa ed America. In Europa, nei passati decenni, infezioni gastroenteriche da *V. parahaemolyticus* sono state segnalate raramente e per questo tale microrganismo non rientra nel sistema di sorveglianza per le infezioni gastroenteriche. Tuttavia, negli ultimi anni, il clone pandemico di *V. parahaemolyticus* O3:K6 ha provocato episodi in Russia (2001), Francia (2004), Spagna (2005) ed Italia (2007). Nell'estate 2008 nel centro Italia avvenivano 2 nuovi casi di gastroenterite acuta e dalle feci dei pazienti il laboratorio ospedaliero isolava batteri identificati come *Vibrio spp.*, che venivano inviati al CEREM per la definitiva caratterizzazione. Qui riportiamo l'indagine epidemiologica effettuata e la caratterizzazione biochimica, molecolare, tossicologica degli isolati.

**Metodi.** Le informazioni epidemiologiche sui casi clinici venivano raccolte dalle schede di notifica (Enter-net Italia) e tramite intervista telefonica al Responsabile del reparto dove i pazienti erano stati ospedalizzati. Gli isolati, identificati biochimicamente, venivano ulteriormente caratterizzati mediante PCR per la presenza dei geni specie-specifici *toxR* e *tlh* e per quelli relativi alle tossine (*tdh* e *trh*). Una PCR gruppo specifica era utilizzata per evidenziare la sequenza *toxRS*, correlata al loro potenziale pandemico, mentre l'elettroforesi pulsata (PFGE) era utilizzata per la tipizzazione molecolare. L'antibioticoresistenza era determinata con il metodo di diffusione in agar secondo le linee guida internazionali.

**Risultati.** Dalle informazioni epidemiologiche raccolte risultava che entrambi i pazienti non avevano effettuato recenti viaggi all'estero, avevano mangiato circa 18 ore prima dei sintomi molluschi bivalvi di provenienza indigena. Il ceppo isolato in agosto veniva identificato come *V. parahaemolyticus* sierotipo O3:K6 *tdh+*/*toxRS+*/*trh-* ed era resistente ad ampicillina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina e cefalexina. Questo ceppo, comparato al ceppo pandemico O3:K6 isolato dal CEREM nel 2007 mostrava un identico profilo di antibioticoresistenza e di PFGE. Il ceppo isolato in settembre veniva identificato come *V. parahaemolyticus* O1:KUT, *tdh-*/*toxRS-*/*trh+* ed era resistente ad ampicillina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalotina, cefalexina e colistina.

**Conclusioni.** Segnaliamo il secondo caso clinico in Italia legato ad un unico clone pandemico di *V. parahaemolyticus* O3:K6 ed il primo in Europa associato a *V. parahaemolyticus* O1:KUT *trh* positivo: in entrambi i casi molluschi bivalvi indigeni rappresentavano la fonte più probabile di contaminazione umana. È auspicabile includere *V. parahaemolyticus* nei sistemi di sorveglianza per le infezioni gastroenteriche e nei programmi di monitoraggio delle aree di raccolta dei molluschi bivalvi.

## GENOTIPIZZAZIONE MEDIANTE MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* DI ISOLAMENTO UMANO ED ANIMALE

Antonio Parisi (a), Giovanni Normanno (b), Laura Latorre (a), Carmen Bonanno (c), Gianfranco Santagada (a), Ida Luzzi (d)

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

(b) Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Valenzano, Bari

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

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

**Introduzione.** *Campylobacter jejuni* è la principale causa di gastro-enterite batterica nei Paesi sviluppati. Le infezioni umane da *Campylobacter* sono causate principalmente dall'ingestione di alimenti di origine animale contaminati, anche se sono stati descritti casi di infezione derivanti dal contatto con animali da affezione o con acque di superficie. In natura i principali serbatoi di *Campylobacter* termofili sono gli uccelli, anche se l'infezione interessa una vasta gamma di animali, sia destinati all'alimentazione che da compagnia, oltre ad uccelli e mammiferi esotici. Lo scopo della presente ricerca era di effettuare una comparazione genetica tra isolati di *C. jejuni* di provenienza clinica ed isolati provenienti da fonti animali ed alimentari.

**Metodi.** Sono stati analizzati 285 stipiti di *C. jejuni* isolati da episodi sporadici di gastro-enterite nell'uomo (n=150), da pollame (n=91), da bovini (n=31) e da altre specie (n=13: ovino n=4; tacchino n=3; fagiano n=2; tordo n=2; piccione n=1; pernice n=1). Tutti gli isolati sono stati caratterizzati mediante *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) come precedentemente descritto ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)).

**Risultati.** Complessivamente sono stati identificati 120 differenti ST, 62 dei quali rappresentati da un unico isolato. I rimanenti ST comprendevano un numero variabile da 2 a 20 isolati. Un terzo circa degli isolati (94/285; 32,98%) ricadeva nei 9 ST maggiormente prevalenti (ST: 50, 122, 21, 824, 572, 19, 45, 5, 2116).

**Conclusioni.** La presente ricerca si proponeva di confrontare tre gruppi di isolati di *C. jejuni* di diversa provenienza per verificare la possibilità di identificare una correlazione tra genotipo e fonte di isolamento ed inoltre di confrontare i dati di caratterizzazione con le informazioni disponibili a livello internazionale. La tecnica di MLST presenta una notevole capacità di discriminazione, il D.I. calcolato sul totale dei 120 ST identificati era pari a 0,994. Il confronto dei dati presenti nel MLST database con i dati ottenuti nella presente ricerca confermano una certa sovrapposibilità della situazione epidemiologica italiana con i dati internazionali. Sebbene con qualche variazione percentuale era possibile notare una notevole similarità nella prevalenza dei principali complessi clonali. Circa le specie di isolamento, l'identificazione di isolati provenienti dalle diverse fonti nei principali complessi clonali non consentiva di individuare cloni specificatamente associati alla malattia nell'uomo piuttosto che a particolari serbatoi animali. Ciononostante si deve sottolineare come le tecniche molecolari forniscano elementi utili alla comprensione della

epidemiologia di questi importanti patogeni e non si può escludere che il continuo monitoraggio e la raccolta organica di informazioni possa consentire in futuro di identificare *markers* utili al riconoscimento dei cloni patogeni all'interno della complessa popolazione di *C. jejuni*.

*Lavoro finanziato dal Ministero della Salute (Ricerca Corrente IZSPB006/05).*

## **P22** GENOTIPIZZAZIONE E ANTIBIOTICO RESISTENZA DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE E DA CAMPIONI AMBIENTALI - DATI PRELIMINARI

Antonio Parisi (a), Laura Latorre (a), Rosa Fraccalvieri (a), Giovanni Normanno (b), Alessia Franco (c), Gianfranco Santagada (a)

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

(b) Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Valenzano, Bari

(c) Centro di Riferenza per l'Antibioticoresistenza, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

**Introduzione.** *L. monocytogenes* è sensibile alla maggior parte degli antibiotici anche se recenti studi hanno evidenziato un incremento della percentuale di ceppi resistenti a vari antibiotici comunemente utilizzati per il trattamento della listeriosi. Lo scopo del lavoro era valutare eventuali relazioni tra antibiotico resistenza e genotipo di ceppi isolati da alimenti di origine animale e da campioni ambientali.

**Metodi.** Sono stati esaminati 100 ceppi di *L. monocytogenes* isolati tra il 1992 ed il 2006, di cui 74 da alimenti e 26 da matrici ambientali, genotipizzati con la tecnica *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST). La MIC è stata valutata con piastre Sensitre® Gram+ GPN4F (TREK *Diagnostic Systems*) contenenti 21 antimicrobici, utilizzando come ceppi di controllo *Escherichia coli* ATCC 25922 ed *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Le resistenze sono state individuate secondo gli standard del CLSI.

**Risultati.** Tutti i ceppi sono risultati sensibili ad ampicillina, rifampina, penicillina G, gentamicina, cloramfenicolo, streptomina, trimetoprim/sulfametossazolo. Tra gli antibiotici verso cui si è riscontrata resistenza si segnalano oxacillina (24%) e tetraciclina (1%); tra quelli con resistenza intermedia clindamicina (19%), quinupristina/dalfopristina (2%) e ciprofloxacina (1%). Dei 100 ceppi, il 43% apparteneva al sierotipo 1/2a, il 24% all'1/2c, il 15% all'1/2b, il 12% al 4b/4e, il 4% al 3a, il 2% al 3b. Nella popolazione di *L. monocytogenes* si distinguono tre linee filogenetiche: la linea I include isolati di sierotipo 4b, 1/2b, 3b, 4d e 4e, la linea II isolati di sierotipo 1/2a, 1/2c, 3a e 3c, la linea III isolati di sierotipo 4a e 4c. Dei 100 ceppi il 29% apparteneva alla linea I e il 71% alla linea II. Dei 24 ceppi resistenti alla oxacillina, 19 (19/24; 79%) appartenevano alla linea I e 5 (5/24; 21%) alla linea II. Dei 19 ceppi con resistenza intermedia alla clindamicina, 4 (4/19; 21%) appartenevano alla linea I e 15 (15/19; 79%) alla linea II.

**Conclusioni.** Il nostro studio conferma la bassa percentuale di resistenza tra gli isolati di derivazione sia ambientale che alimentare. Un'interessante correlazione statistica è stata evidenziata per la resistenza alla oxacillina tra gli isolati delle linee genetiche I e II; infatti tale resistenza era significativamente più frequente nella linea I (*Yates corrected* = 35,46;  $p < 0,005$ ). Questo è in linea con la organizzazione tipicamente clonale della popolazione di *L. monocytogenes*. La gravità delle infezioni da *L. monocytogenes* e il segnalato incremento dei fenomeni di resistenza impone un monitoraggio continuo anche se attualmente i dati

non sembrano allarmanti. Il confronto delle caratterizzazioni fenotipiche con quelle genetiche consente di validare i modelli evolutivi ipotizzati per questa specie microbica.

*Si ringraziano per la collaborazione tecnica le Dott.sse Brigida Giove, Cristina Tremamunno, Mariella Natale e Luisa Cafaro.*

*Lavoro finanziato dal Ministero della Salute (Ricerca Corrente IZSPB05/08).*

## ENTERITE DA NOROVIRUS IN ETÀ PEDIATRICA: SORVEGLIANZA E CASI SPORADICI

Silvana Perin (a), Maddalena Gibelli (b), Alberto Podestà (b), Giuseppe Russello (a), Claudio Farina (a)

(a) *Unità Operativa Complessa di Microbiologia e Virologia, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano*

(b) *Unità Operativa Complessa di Pediatria, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano*

**Introduzione.** L'eziologia virale delle enteriti è ancora oggi sottostimata. Accanto a virus il cui ruolo eziologico è stato da tempo dimostrato (Enterovirus, Adenovirus e Rotavirus) esistono evidenze clinico-epidemiologiche relative al coinvolgimento di Calicivirus (Norwalk-like, Sapporo-like virus) e di Astrovirus in episodi epidemici di gastroenterite. Il quadro clinico giustifica la definizione di *winter vomiting disease* attribuita nel 1968 alla forma da Norwalk virus (ora chiamati Norovirus): tale dizione definisce l'aspetto caratteristico della stagionalità, tipicamente tardo invernale-inizio primaverile (il periodo febbraio-maggio rappresenta l'acme della patologia), di queste forme spesso epidemiche in collettività chiuse (case di riposo) o semichiuse (asili).

**Obiettivi.** Lo scopo della presente revisione retrospettiva delle infezioni da Norovirus è valutare l'epidemiologia e gli aspetti clinici delle forme osservate in età pediatrica, al fine di verificarne il ruolo anche nelle forme "sporadiche" di gastroenterite.

**Materiali e metodi.** I campioni fecali di 658 bimbi ricoverati per gastroenterite presso l'UOC Pediatria, AO "Ospedale San Carlo Borromeo" nel triennio 2006-2008 sono stati esaminati per la ricerca di *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, Rotavirus, Astrovirus e Norovirus. La ricerca di Norovirus è stata eseguita utilizzando il kit IDEIA Noro, Oxoid.

**Risultati.** La diagnosi eziologica di enterite da Norovirus è stata possibile nel 13,5% dei casi. In particolare: 16 M, 14 F; età media: 33+23 mesi (*range*: 1-67 mesi) con prevalenza nella fascia di età 0-24 mesi (66,6%); durata dei sintomi: 2,9+1,5 giorni (*range*: 1,7 giorni) correlata a febbre e vomito e con durata inversamente proporzionale all'età; stagionalità: febbraio-maggio.

**Conclusioni.** I dati del nostro Centro mostrano come la circolazione di Norovirus non sia responsabile esclusivamente di episodi epidemici, ma possa essere descritta routinariamente nella pratica clinica, manifestandosi anche con carattere di sporadicità, e rendendosi talora responsabile di forme clinicamente "intricate". Ciò induce alla ricerca sistematica di Norovirus in tutti i soggetti con gastroenterite acuta, specie se di età inferiore a 2 anni, determinando la necessità di estendere lo spettro delle ricerche virologiche in questa fascia di età anche a questi virus. Si segnala che nei soggetti più grandicelli l'unico sintomo all'esordio può essere costituito solo da dolore addominale, mentre nei più piccoli non raramente si associa una sintomatologia neurologica.

## ESEMPIO DI CORRETTA GESTIONE DI UN EPISODIO DOMESTICO DI MALATTIA VEICOLATA DA ALIMENTI

Mariella Talini (a), Costanza Pierozzi (b), Wanda Wanderlingh (c)

(a) *Unità Funzionale Biotossicologia, Azienda USL 3, Pistoia*

(b) *Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari, Regione Toscana, Pistoia*

(c) *Unità Funzionale Igiene Sanità Pubblica, Azienda USL 3, Pistoia*

**Introduzione.** Nel settembre 2008 a seguito di un pranzo di famiglia presso l'abitazione di CM, alcuni commensali, a distanza di circa 24 ore dal pasto, hanno accusato sintomi gastroenterici (vomito, diarrea, dolori addominali). Il menù consisteva di: antipasto toscano, arancini siciliani, porchetta con piselli, spinaci, millefoglie di pasticceria. Alcuni arancini non assunti sono stati regalati ad amici che li hanno consumati il giorno successivo conservandoli a temperatura ambiente. Le persone che hanno assunto gli alimenti sospetti sono state 18, i casi confermati sono stati 8 ed i probabili 3 (caso confermato = paziente con sintomatologia e coprocoltura positiva che ha partecipato al pasto sospetto, caso probabile = paziente con sintomatologia suggestiva, che ha partecipato al pasto sospetto ma non ha eseguito coprocoltura o con coprocoltura negativa). Due persone sintomatiche sono state ricoverate in ospedale (una donna al nono mese di gravidanza per intervento cesareo di urgenza, l'altro con complicanze pancreatiche e permanenza in Ospedale di circa 1 mese).

**Metodi.** Gli alimenti sottoposti ad analisi microbiologica sono stati: uova (tuorlo e guscio), porchetta, ragù confezionato in confezione integra e ragù in confezione aperta, utilizzato per arancini, pasta pasticciata congelata preparata nello stesso giorno e con lo stesso ragù utilizzato per la preparazione degli arancini.

**Risultati.** Le persone che hanno partecipato al pasto, sintomatiche e non hanno eseguito coprocoltura che ha rilevato la presenza di *Salmonella* enteritidis in 8 pazienti. Tra gli alimenti analizzati il guscio delle uova, la pasta pasticciata (non consumata al pranzo) sono risultati positivi alla ricerca di *Salmonella* enteritidis che è stata successivamente rinvenuta in un canovaccio da cucina utilizzato durante la preparazione degli alimenti per asciugare gli utensili e le mani e successivamente lavato in lavatrice a 40°C. A seguito della provata presenza di *Salmonella* nelle uova è stata inviata comunicazione all'Azienda USL di competenza, che ha effettuato un sopralluogo nell'azienda produttrice. Durante il sopralluogo dell'allevamento sono stati effettuati esami di feci e tamponi ambientali per la ricerca di *Salmonella* e che hanno dato esito negativo. I ceppi isolati dai pazienti e dagli alimenti sono stati inviati al Centro Malattie Batteriche Gastroenteriche dell'ISS per la tipizzazione mediante Elettroforesi in campo e hanno mostrato il medesimo profilo genetico di restrizione.

**Conclusione.** La gestione di questo episodio è un esempio di corretta e completa analisi di tutte le variabili implicate nell'episodio compresa la tracciabilità dell'alimento responsabile della tossinfezione.

## **REGIONE VENETO: MONITORAGGIO DELLE ZONOSI A TRASMISSIONE ALIMENTARE NEGLI ANIMALI DA REDDITO**

Antonia Ricci (a), Lisa Barco (a), Veronica Cibin (a), Marzia Mancin (a), Antonello Ketì (a), Claudio Minorello (a), Cristina Saccardin (a), Maria Cristina Dalla Pozza (a), Elena Ramon (a), Paola Zavagnin (a), Elisa Marafin (a), Antonia Anna Lettini (a), Michele Brichese (b), Piero Vio (b)

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

(b) *Unità di Progetto per la Sanità Animale e la Sicurezza Alimentare, Regione Veneto, Venezia*

La normativa vigente a livello europeo (Direttiva 2003/99/CE e Regolamento CE 2160/2003) prescrive che gli Stati Membri realizzino piani di monitoraggio mirati a definire la situazione sanitaria dei principali agenti zoonotici nelle popolazioni animali.

Il controllo delle zoonosi a trasmissione alimentare, come pure della diffusione dell'antibioticoresistenza, sono considerati interventi prioritari da realizzare nell'ambito della sanità pubblica.

Allo scopo di applicare in ambito regionale i requisiti stabiliti dalla normativa comunitaria, la Regione Veneto ha realizzato nel periodo 2002-2007 due "Piani Triennali per la Sicurezza Alimentare". Per lo sviluppo di tali progetti è stata adottata una strategia multidisciplinare, basata sullo sviluppo integrato di diversi aspetti correlati alla sicurezza alimentare. Particolare attenzione è stata riservata alla realizzazione di piani di monitoraggio dei patogeni alimentari nelle popolazioni animali allevate nel territorio regionale, quali bovini, suini e avicoli. L'attività di sorveglianza si è sviluppata in tre campagne (2002-2003, 2004 e 2005-2006) finalizzate a verificare l'andamento delle prevalenze di *Salmonella* e *Campylobacter*, come pure la diffusione della resistenza antibiotica dei batteri patogeni (*Salmonella*) e degli indicatori (*E. coli*, *Enterococcus*). Numerosità campionaria e modalità di campionamento sono state gradualmente rimodulate a partire dai dati raccolti, in modo tale da ridurre progressivamente la numerosità delle analisi, mantenendo inalterata l'attendibilità delle stime di prevalenza.

Per quanto riguarda il monitoraggio dei bovini, le prevalenze maggiori sono state registrate nel corso della campagna 2005-2006, che prevedeva l'analisi di 15 animali per partita, a differenza delle precedenti basate sull'analisi di un singolo soggetto. I valori di prevalenza per *Salmonella* e *Campylobacter* sono risultati rispettivamente pari a 5,56% e 61,11%. Analogamente il monitoraggio nei suini è stato progressivamente rimodulato. Inizialmente la ricerca è stata eseguita da feci prelevate da un singolo soggetto per partita, quindi, nel corso dell'ultima campagna sono stati sottoposti a campionamento 15 animali per partita, analizzando campioni di linfonodi mesenterici. I valori di prevalenza per *Salmonella spp.* nei suini, riscontrati nel corso dell'ultima campagna di monitoraggio, risultano pari a 60,91%.

Per i polli le prevalenze rilevate nelle tre campagne sono risultate sempre superiori a 34% e 83% rispettivamente per *Salmonella* e *Campylobacter*. Infine, per i tacchini è stata registrata una riduzione dei valori di prevalenza di *Salmonella*, passando da 53,97% (campagna 2002-2003), fino a valori pari a 27,44% nell'ultimo monitoraggio. *Trend* opposto è stato registrato per *Campylobacter* si è passati infatti da valori di prevalenza pari a 52,34%, durante la campagna 2002-2003, a valori superiori al 90%, riscontrati nelle successive campagne di monitoraggio.

## RETE ENTER-VET: RISULTATI DELL'ATTIVITÀ 2007-2008

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(l) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo*

(m) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari*

Nel biennio 2007-2008 nell'ambito della rete di sorveglianza Enter-vet sono state raccolte informazioni relativamente a 4.728 e 4.887 ceppi di *Salmonella* tipizzati presso gli IZS di riferimento.

La maggior parte dei ceppi è stata isolata da campioni animali e alimentari (rispettivamente 3.906 e 2.353 stipiti nel biennio). Rispetto agli anni precedenti si è registrato un notevole aumento del numero dei campioni di origine "non nota", per i quali cioè non sono disponibili sufficienti informazioni.

Gli stipiti isolati da suino e pollo rappresentano più della metà delle notifiche (rispettivamente il 58,08% degli isolati nel 2007 e 67,37% nel 2008). Il sierotipo più rappresentato è *S. Typhimurium* con una frequenza pari a 18,59% nel 2007 e 12,3% nel 2008, seguito da *S. Derby* (frequenza pari a 8,31% nel 2007 e 9,17% nel 2008). Tali prevalenze sono probabilmente attribuibili all'elevata percentuale di isolati da suino, dal momento che, soprattutto *S. Derby*, rappresenta un sierotipo tipico di questa specie.

Altri sierotipi isolati con frequenza elevata risultano essere *S. Enteritidis* (5,52% nel 2007 e 8,47% nel 2008) e il ceppo monofasico 1,4,5,12:i:- (5,84% nel 2007 e 8,04% nel 2008). Nel 2008 si è registrato un decremento nelle percentuali di isolamento di *S. Bredeney* (7,06% nel 2007 e 4,97% nel 2008,) e *S. Livingstone* (6,45% nel 2007 e 4,85% nel 2008). Di rilievo inoltre l'incremento degli isolamenti di *S. Hadar* (3,96% nel 2007 e 6,63% nel 2008).

Considerando i sierotipi isolati con frequenza maggiore nelle specie animali più rappresentate nella rete Enter-vet si nota che *S. Livingstone* (17,29%) e *S. Enteritidis* (18,38%) risultano i sierotipi più comuni nel pollo rispettivamente nel 2007 e 2008, mentre nel tacchino i primi sierotipi sono *S. Bredeney* (24,24%) nel 2007 e *S. Newport* (17,16%) nel

2008. Infine, *S. Derby* (23,90% nel 2007 e 23,44% nel 2008) e *S. Typhimurium* (23,07% nel 2007 e 18,17% nel 2008) rappresentano i sierotipi più comuni nel suino.

Per quanto riguarda i risultati della tipizzazione fagica nel 2007 e 2008 i fagotipi di *S. Typhimurium* più comuni sono DT104 e U302, quest'ultimo fagotipo prevalentemente di origine suina. La frequenza di isolamento di ceppi non tipizzabili NT e di quelli caratterizzati da lettura stabile non identificata, è rimasta, come negli anni precedenti, piuttosto elevata e generalmente ripartita tra tutte le diverse matrici. I fagotipi più comuni di *S. Enteritidis* risultano essere PT4 e PT1 sia nel 2007 che nel 2008, identificati con frequenza particolarmente elevata nel pollo.

## **P23 PREVALENZA DI GENI ASSOCIATI ALLA RESISTENZA AI COMPOSTI DELL'AMMONIO QUATERNARIO (QACS) E VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DOPO TRATTAMENTO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* CON BENZALCONIOCLORURO (BAC)**

Giancarlo Ripabelli, Francesca Mercogliano, Incoronata Fanelli, Monia Vitullo, Manuela Tamburo, Michela Lucia Sammarco

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

**Introduzione.** È stata dimostrata la resistenza di *L. monocytogenes* ai composti QACs mediata da pompe di efflusso. Obiettivo dello studio è stato quello di valutare: l'attività antibatterica del BAC; la prevalenza dei geni *mdrL* (codificante per il sistema di efflusso) e *orfA* (codificante per il repressore di MdrL); la sensibilità agli antibiotici dopo trattamento con BAC.

**Metodi.** Sono stati selezionati 6 isolati di *L. monocytogenes* da campioni clinici, 20 da alimenti e 4 da tamponi ambientali. Sui ceppi è stata valutata l'attività del BAC secondo procedura ISO1276/2000, trattandoli con concentrazioni di 50 e 10 ppm ad intervalli di tempo 0, 5 e 15 minuti, in condizioni di pulito e di sporco (0,3% e 3% BSA). Sui ceppi sopravvissuti al trattamento è stata effettuata la ricerca dei geni *mdrL* e *orfA* mediante PCR. La sensibilità a penicillina, gentamicina, oxacillina, clindamicina, eritromicina e cloramfenicolo è stata valutata misurando gli aloni di inibizione dei ceppi seminati su agar sangue immediatamente dopo la fine di ciascun tempo di contatto con il disinfettante, previa centrifugazione e lavaggio con soluzione fisiologica.

**Risultati.** In condizioni di pulito tutti i ceppi sono risultati sensibili alla concentrazione 50 ppm; in condizioni di sporco l'86,7% degli isolati è stato resistente al tempo zero. Alla concentrazione di 10 ppm e condizioni di pulito è stata osservata resistenza al tempo zero, mentre ai tempi 5 e 15 minuti i ceppi sono risultati sensibili, anche se tutti presentavano colonie sopravvissute al trattamento. In condizioni di sporco tutti gli isolati non hanno mostrato riduzione dopo il trattamento a tutti i tempi di contatto. Prima del trattamento la prevalenza del gene *mdrL* è risultata pari all'83,3% negli isolati umani, 86,7% in quelli da alimenti e 50% in quelli ambientali; la prevalenza si è drasticamente ridotta dopo trattamento. È stata, inoltre, osservata, una minore prevalenza del gene *orfA* per isolati umani e da alimenti sia prima (16,7% e 60%) sia dopo trattamento (0% e 53,3%) rispetto agli isolati ambientali (prima del trattamento 100%, dopo 75%). I ceppi sono risultati resistenti solo a oxacillina e clindamicina. Dopo trattamento con BAC i ceppi hanno mostrato un aumento medio degli aloni di inibizione del 10% per quasi tutti gli antibiotici testati.

**Conclusioni.** Sebbene alle concentrazioni e tempi testati sia emersa una generale tolleranza degli isolati al BAC, correlata plausibilmente con la capacità di impedirne

l'accumulo mediante sistemi di degradazione/modificazione e pompe di efflusso, i trattamenti disinfettanti possono rendere più sensibile *L. monocytogenes* all'azione degli antibiotici. Probabilmente la causa è da ricercare in alterazioni della permeabilità di membrana e/o danneggiamento di sistemi aspecifici di resistenza.

## **P24** **SORVEGLIANZA ITALIANA DELLE INFEZIONI DA VTEC ASSOCIATE A SINDROME EMOLITICO UREMICA NEL PERIODO 2005-2008**

Gaia Scavia (a), Francesca Baldinelli (a), Susan Babsa (a), Martina Escher (a), Caterina Graziani (a), Maria Luisa Marziano (a), Valeria Michelacci (a), Fabio Minelli (a), Stefano Morabito (a), Rosangela Tozzoli (a), Carmine Pecoraro (b), Alfredo Caprioli (a)  
(a) *Laboratorio Nazionale di Riferimento per E. coli, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
(b) *Ospedale Santobono-Pausillipon, Napoli*

**Introduzione.** La Sindrome Emolitico Uremica (SEU) è una malattia di notevole gravità che colpisce soprattutto i bambini. Si sviluppa in seguito a infezione da stipiti di *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC). In Italia la sorveglianza delle infezioni da VTEC associate a SEU rientra tra le attività del Registro Nazionale della SEU pediatrica, in connessione con la rete Enter-net.

**Metodi.** La sorveglianza della SEU coinvolge i principali centri ospedalieri di nefrologia pediatrica italiani che segnalano i casi e inviano i campioni biologici dei pazienti al Laboratorio Nazionale di Riferimento presso l'ISS. Le indagini diagnostiche per VTEC si basano sulle seguenti tecniche: ricerca dei principali fattori di virulenza (*vtx1*, *vtx2*, *eae*) mediante PCR in colture di *E. coli* da campioni fecali; isolamento dei ceppi dai campioni fecali e identificazione dei sierogruppi VTEC mediante sierotipizzazione, ricerca della VT fecale libera, mediante saggio su cellule Vero; ricerca di anticorpi sierici anti-LPS dei principali sierogruppi, mediante ELISA.

**Risultati.** Tra il 2005 e il 2008, 17 centri ospedalieri hanno segnalato 158 casi di SEU. L'età mediana dei pazienti era di 2 anni e 7 mesi (*range* 4 mesi-15 anni). I pazienti provenivano da 18 Regioni, prevalentemente Veneto, Lombardia, Campania, e Piemonte. 11 pazienti hanno manifestato SEU dopo un soggiorno all'estero, 4 dei quali in Egitto. La maggior parte dei casi presentava diarrea prodromica acquosa (64%) o emorragica (24%). Evidenze di infezione da VTEC sono state riscontrate in 96 (66%) dei casi esaminati. L'informazione sui sierogruppi è derivata dalla sierotipizzazione dei ceppi isolati in 14 casi e dalla identificazione degli anticorpi anti-LPS sierogruppo specifici in 77 casi. Sono stati identificati complessivamente otto diversi sierogruppi VTEC, i più frequenti erano O26 (N=31), O157 (N=23), O111 (N=14), O103 (N=12), O145 (N=11). Da un caso di SEU associato a VTEC O157 è stato isolato un ceppo fermentante il sorbitolo. Si tratta della prima segnalazione nel nostro Paese. Sono inoltre stati identificati tre episodi epidemici, tutti associati a VTEC O26.

**Conclusioni.** La sorveglianza della SEU costituisce a tutt'oggi l'unico sistema efficace di monitoraggio e caratterizzazione delle infezioni da VTEC in Italia, con particolare riferimento alla dinamica dei sierogruppi e alla identificazione degli episodi epidemici in comunità. Rispetto al periodo precedente è aumentato il numero di pazienti per i quali erano disponibili i campioni diagnostici, e la proporzione dei casi esaminati risultati positivi per VTEC. Si è inoltre registrato un ulteriore aumento della proporzione di casi associati a sierogruppi VTEC non-O157.

## **P25 ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA ENTER-NET IN UMBRIA NEL PERIODO 2007-2008**

Stefania Scuota, Viviana Bazzucchi, Alessia Zicavo  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

Si riportano i dati relativi alle notifiche di batteri enteropatogeni effettuate al Centro di Riferimento Regionale di Perugia nel biennio 2007-2008. La quasi totalità dei Laboratori pubblici territoriali che operano in Medicina Umana partecipano attivamente al Sistema di Sorveglianza attraverso l'invio e la notifica puntuale e costante dei ceppi. Nel corso dei due anni esaminati, il numero di segnalazioni relative a *Salmonella spp.* di origine umana è risultato pari a 505, registrando un incremento del 14% rispetto al biennio precedente. Per quanto riguarda altri enteropatogeni diversi da *Salmonella* in ambito umano, le segnalazioni sono rappresentate principalmente da *Campylobacter* e, in misura minore, da *Aeromonas* e da *Yersinia enterocolitica*. Per quanto riguarda la distribuzione di *Salmonella spp.* nelle varie fasce di età e la frequenza di ospedalizzazione, i dati riscontrati in Umbria in ambito umano non si discostano significativamente da quelli osservati a livello nazionale. Il sierotipo più frequentemente isolato, così come osservato a livello nazionale, rimane *S. Typhimurium* (39,80%); nell'ultimo biennio è andato costantemente aumentando il numero dei ceppi appartenenti al cosiddetto "nuovo sierotipo" con formula antigenica 4,5,12;i;- , che hanno raggiunto una frequenza del 21,98%, di gran lunga superiore a quella di *S. Enteritidis* (9,70%). Gli altri sierotipi di *Salmonella* più frequentemente isolati ricalcano essenzialmente il dato nazionale, ad eccezione di *S. London* (5,15%) e *S. Bredeney* (4,16%); entrambi questi sierotipi sono stati responsabili di episodi tossinfettivi. Nel corso del periodo considerato, *E. coli* O157 è stato isolato in due casi da fonte umana e una volta da carne suina, confermando la bassa incidenza del patogeno nella nostra Regione. Il numero di salmonelle di origine veterinaria (n. 354) rimasto sostanzialmente invariato rispetto al biennio precedente e con una netta prevalenza di quelle isolate da alimenti (65,29%), che vengono per la maggior parte notificate da Laboratori privati che operano nell'ambito dell'Autocontrollo. I ceppi di *Salmonella* di origine veterinaria sono stati isolati prevalentemente da suini, da pollame e dagli alimenti da questi derivati. Bassissimo è invece il riscontro in uova e in preparazioni gastronomiche a base di uova. Sono rimaste costantemente basse le notifiche relative a ceppi di *Salmonella* di origine ambientale.

## **P26** INDAGINE SULLA PRESENZA DI VIBRIO E VIRUS PATOGENI IN MOLLUSCHI, CROSTACEI E PESCI DEL MAR LIGURE

Laura Serracca (a), Antonio Barbaro (b), Angelo Droetto (c), Alessandro Canova (c), Walter Dini (d), Gualtiero Fazio (d), Enzo Secco (e), Mino Orlandi (e), Giacomo Poirè (f), Sandro Palmero (g), Carlo Ercolini (a)

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

(b) Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(c) Azienda Sanitaria Locale 3, Genova

(d) Azienda Sanitaria Locale 2, Savona

(e) Azienda Sanitaria Locale 5, La Spezia

(f) Azienda Sanitaria Locale 4, Chiavari

(g) Azienda Sanitaria Locale 1, Imperia

**Introduzione.** La ricerca di vibrioni e virus patogeni non è attualmente regolamentata, sarà inserita nel Regolamento 2073/2005 solo dopo standardizzazione e validazione delle metodiche da parte del Comitato Europeo di Standardizzazione metodi CEN; tuttavia essa è raccomandata se la situazione epidemiologica lo richiede. Per tale ragione la Liguria ha ritenuto utile impostare due piani di monitoraggio (2007-2009) per la ricerca di Vibrio patogeni (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) e virus patogeni (Virus epatite A e Norovirus) allo scopo di verificarne la presenza nei prodotti ittici pescati nel Mar Ligure.

**Metodi.** I campioni (N=278), prelevati nei mercati ittici delle province di La Spezia, Genova, Savona ed Imperia, rappresentati da molluschi bivalvi depurati (N=50) per la ricerca di Virus Epatite A e Norovirus e pesci, crostacei e molluschi cefalopodi (N=228) per la ricerca di vibrioni patogeni. La ricerca di Vibrio è stata eseguita seguendo la metodica ISO 21872. I ceppi identificati, con prove biochimiche, sono stati confermati in PCR ed è stata valutata la capacità di produrre tossine rispettivamente per *V. parahaemolyticus*: TDH, TRH e per *V. cholerae*: STO. La determinazione del virus epatite A è stata effettuata mediante *RT-Heminested* PCR con amplificazione di una Regione conservata del genoma virale codificante per proteine capsidiche VP1-VP2-VP3. Per la ricerca di Norovirus è stata scelta una *booster* PCR con *primer* selezionati dalla bibliografia per una Regione codificante la RNA polimerasi RNA dipendente, contenenti basi degenerate, per aumentare le possibilità di appaiamento con le *sequenze target*.

**Risultati.** La percentuale di campioni positivi è stata del 1,8 (4/228) per *V. parahaemolyticus* isolati in totani provenienti dalla Provincia di Savona ed in mitili del golfo di La Spezia. Non è stato effettuato nessun isolamento di *V. cholerae* O1 - non O1 e *V. vulnificus*. In nessuno dei campioni di mitili depurati è stata rilevata presenza di genoma virale di Norovirus e Virus Epatite A.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti disegnano uno scenario confortante; le uniche positività sono rappresentate da ceppi di *V. parahaemolyticus* risultati non tossigeni, pertanto non costituiscono un problema sanitario in quanto la patogenicità del microrganismo è legata

esclusivamente alla capacità di produrre tossine. Tuttavia questo riscontro deve indurre una certa cautela spingendo alla rigorosa applicazione delle buone pratiche di igiene ed al rispetto della catena del freddo in fase di commercializzazione, così come deve essere raccomandato che il prodotto sia consumato previa cottura.

## **P27 RICERCA DI NOROVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI: OTTIMIZZAZIONE DELLE *PERFORMANCE* IN *BOOSTER-PCR***

Laura Serracca (a), Irene Rossini (a), Carlo Ercolini (a) Enrico Pavoni (b), Marina Nadia Losio (b)

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

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

Nell'ambito del progetto di ricerca corrente 2007 inerente lo sviluppo di metodiche per la determinazione di Norovirus nei molluschi bivalvi, i laboratori sopra citati hanno cercato di ottimizzare le *performance* di metodiche in *booster-PCR* ricavate da bibliografia scientifica.

Il metodo diagnostico di scelta, attualmente, è la *reverse transcriptase* PCR. La diagnosi molecolare mediante PCR e sequenziamento infatti, consente di determinare il genotipo del ceppo, informazione spesso indispensabile per stabilire il nesso di causalità tra epidemie e veicoli d'infezione, soprattutto alimentari.

La ricerca del genoma virale è stata effettuata mediante una *booster-PCR* che utilizza *primers* degenerati per un frammento di 326 bp della Regione della RNA-polimerasi RNA-dipendente. In questo lavoro sono stati sperimentati diversi protocolli di retro trascrizione. In particolare sono stati confrontati i risultati ottenuti utilizzando quattro differenti concentrazioni di dNTPs: 0,5mM, 1mM, 2mM e 4mM.

Nell'ambito delle amplificazioni, invece è stata valutata l'influenza del cloruro di magnesio in relazione a diverse concentrazioni di enzima Taq. Il *range* di cloruro di magnesio testato va da 1,5mM a 3mM. Come campioni positivi sono stati utilizzati virus certificati da QCMD di Norovirus GII e Norovirus GI quantificati in PCR *real-time* con un Ct rispettivamente di 32,96 e 34,90. Per quanto riguarda la Taq, sono invece state provate due concentrazioni: 1,25 U/50 $\mu$ L e 2U/50 $\mu$ L. I protocolli di retrotrascrizione sono stati saggiati su uno dei due controlli QCMD, quello con Ct più alto e nelle condizioni che sono risultate ottimali dalle prove di messa a punto della *booster-PCR*.

I risultati ottenuti evidenziano che l'aumento della concentrazione di Taq non mostra un incremento di segnale. La concentrazione del cloruro di magnesio invece agisce in modo evidente sulla resa della reazione; si è potuto notare un incremento di segnale nel passaggio dalla concentrazione 2mM a 2,5mM. Tale incremento non si è ottenuto nell'utilizzo di un quantitativo superiore di cloruro di magnesio pari a 3mM. Le modifiche apportate alla retrotrascrizione relative al quantitativo di dNTPs non hanno modificato in nessun modo l'intensità del segnale dei campioni.

In conclusione le variazioni apportate al protocollo di amplificazione hanno permesso di ottimizzare le *performance* della prova individuando le concentrazioni ottimali di reagenti, in particolare: MgCl<sub>2</sub> 2,5mM e Taq 1,2U/50 $\mu$ L. Per quanto riguarda la retro trascrizione, la concentrazione migliore di dNTPs risulta essere di 0,5mM sia dal punto di vista di intensità del segnale che di economia nell'uso del reagente.

## **P28 RICERCA DI SALMONELLA NELLE ACQUE SUPERFICIALI: RISULTATI DEL MONITORAGGIO DAL 2006 NEI CORSI D'ACQUA SUPERFICIALE IN PROVINCIA DI BOLZANO**

Alberta Stenico, Margit Seeber, Paola Blasior, Mariarosaria Mupo, Elisa Romanin, Gaby Spitaler

*Laboratorio Biologico, Agenzia Provinciale per l'Ambiente, APPA, Bolzano*

**Introduzione.** La ricerca di *Salmonella* nelle acque superficiali ha come obiettivo il monitoraggio della contaminazione fecale nei corsi d'acqua, che entro il 2015 devono raggiungere lo stato di qualità "buono" secondo la Direttiva Europea 2000/60. Inoltre può dare informazioni, utili ad esempio in caso di eventi epidemici, sulle diverse specie di *Salmonella* presenti sul territorio. Da oltre dieci anni nella Provincia Autonoma di Bolzano si esegue la ricerca di *Salmonella* nei campioni di acqua superficiale prelevati per il monitoraggio della qualità secondo il D.Lgs. 152/06.

**Metodi.** La ricerca per *Salmonella* è stata eseguita secondo il metodo ISO 6340:1995 su 1 litro di campione. Per ogni campione positivo è stata eseguita la tipizzazione sierologica e la tipizzazione genetica. La caratterizzazione genetica è stata eseguita tramite la ribotipizzazione con il sistema automatizzato Riboprinter, Qualicon, USA applicando l'enzima di restrizione PvuII.

**Risultati.** Dal 2006 ad agosto 2009 sono stati analizzati complessivamente oltre a 1.200 campioni, circa il 10% è risultato positivo per la presenza di *Salmonella*. Nel periodo 2002-2005 sono stati analizzati lo stesso numero di campioni, in questo periodo è risultato positivo il 20% dei campioni. Dal 2006 sono state identificate oltre 40 specie diverse, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhymurium sono le specie più frequentemente identificate (rapporto 5:4) e insieme rappresentano circa un terzo dei ceppi isolati nei corsi d'acqua. Anche i ceppi isolati prima del 2006 sono rappresentati per circa un terzo da queste due specie, ma *Salmonella* Enteritidis è più frequente. La ribotipizzazione di *Salmonella* Enteritidis non ha distinto geneticamente i ceppi isolati, mentre per altre specie possono essere distinti diversi "ribotipi", caratteristica utile per ulteriori indagini ad esempio epidemiologiche, per l'individuazione di una fonte d'infezione. Per alcune specie invece la tipizzazione genetica non corrispondeva a quella sierologica.

**Discussione.** È interessante osservare la diminuzione dei campioni positivi per *Salmonella* negli ultimi anni. Questo è sicuramente dovuto anche al fatto che gran parte degli scarichi civili e industriali vengono depurati prima di essere immessi nei corsi d'acqua. L'incongruenza tra tipizzazione genetica e tipizzazione sierologica di alcuni ceppi deve essere oggetto di ulteriori indagini.

## **P29 HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS (HRMA) PER LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI LIPI-1 E INLAB IN *LISTERIA MONOCYTOGENES***

Manuela Tamburo (a), Kathie Grant (b), Corinne Amar (b), Mirella Pontello (c), Michela Lucia Sammarco (a), Giancarlo Ripabelli (a)

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

(b) *Centre for Infection, Laboratory of Gastrointestinal Pathogens, Health Protection Agency, Colindale, United Kingdom*

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

**Introduzione.** HRM è una tecnica recente, rapida ed accurata, in grado di determinare differenze di sequenza nei prodotti di PCR. I saggi si basano sull'analisi delle curve di *melting* con l'impiego di intercalanti di terza generazione in grado di saturare completamente il DNA. I geni responsabili della virulenza di *L. monocytogenes* sono localizzati nel *cluster* dell'isola di patogenicità LIPI-1 e nel *locus* delle internaline A e B. È stato dimostrato che alcuni isolati, soprattutto da alimenti, producono proteine troncate con ridotta virulenza e patogenicità a causa di SNPs nelle sequenze geniche. Obiettivo dello studio è stato quello di sviluppare e standardizzare saggi di HRM per l'identificazione di mutazioni in geni associati alla virulenza.

**Metodi.** Sono state disegnate *ex-novo*, sulla base delle sequenze di riferimento di *L. monocytogenes* EGD-e e F2365, 53 coppie di *primer overlapping* per la caratterizzazione di LIPI-1 e dei geni *housekeeping prs* e *ldh*, e 28 per la Regione delle internaline A e B. Sono stati analizzati 26 isolati da casi umani, con sierotipo e linea genetica noti, in parallelo con un controllo positivo *L. monocytogenes* NCTC 11994 e un controllo negativo *L. innocua* NCTC 11288. L'amplificazione dei frammenti genici, seguita dalla fase di *melting*, è stata condotta utilizzando EvaGreen™ dye (Biotinum) e AmplitaqGold polimerasi nel sistema 7500 *Fast real-time* PCR (Applied Biosystems). I dati di fluorescenza sono stati analizzati con software HRM (version 2.0, Applied Biosystems) per l'analisi dei valori di  $T_m$  di ciascun amplicone.

**Risultati.** Il valore massimo della deviazione standard delle  $T_m$ , determinato a partire dalla media ottenuta dal ceppo di riferimento EGD-e, è stata di  $\pm 0,39^\circ\text{C}$ . Ciascun *marker* con valore di  $T_m > 0,39^\circ\text{C}$  indicava una differenza nella sequenza genica, confermata successivamente dal sequenziamento. In generale, sono state osservate notevoli differenze dei prodotti di PCR in esame: 8 *markers* presentavano  $T_m$  specifiche per la linea genetica II (1/2a e 1/2c) e 11 erano specifici per la linea genetica I (1/2b e 4b). Il gene *hlyA* è risultato conservato per entrambe le linee genetiche. Solo i ceppi con sierotipo 4b hanno mostrato variazioni nella sequenza del gene *prs*. Molteplici variazioni, inoltre, sono state osservate per le  $T_m$  relative ai geni *actA*, *inlA* e *inlB*, nei quali la presenza di SNPs è associata con l'espressione di proteine troncate e ridotta virulenza.

**Conclusioni.** L'analisi in HRM di differenti *target* molecolari è una tecnica sensibile e riproducibile per discriminare le diversità di sequenza nei prodotti di PCR. Inoltre, costituisce un metodo innovativo per la caratterizzazione della capacità patogenetica e di virulenza di *L. monocytogenes*.

## **P30** FREQUENZE DEGLI ISOLAMENTI DI *SALMONELLA* DA UOMO, ALIMENTI ED ANIMALI NELL'AMBITO DELLA SORVEGLIANZA DEL CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER GLI ENTEROBATTERI PATOGENI DELL'IZS LAZIO E TOSCANA NEL TRIENNIO 2006-2008

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

Il Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni esegue per la sorveglianza di laboratorio nell'ambito delle reti Enter-net (*Enteric Pathogen Network*) ed Enter-vet, la sierotipizzazione di stiptipi di *Salmonella* isolati dall'uomo nella Regione Lazio e da campioni di origine veterinaria nelle Regioni Lazio e Toscana. Nel corso del triennio 2006-2008 sono stati notificati dati relativi a 1.979 ceppi di *Salmonella* di cui 1.246 (63%) di origine umana e 733 (37%) di origine veterinaria (alimenti e animali). Nell'uomo i sierotipi più frequentemente isolati sono risultati *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. *S. Typhimurium* primo sierotipo isolato nel 2008 e nel 2007 ha raggiunto frequenze di 40,1% e 40,0% rispettivamente, mentre nel 2006 si è collocato al 2° posto con una frequenza di 25,8%. Situazione capovolta per *S. Enteritidis* che ha fatto registrare una sensibile diminuzione passando da frequenze del 41,3% nel 2006 al 31,6% nel 2007 e al 24,9% nel 2008. Consolidato il terzo posto per frequenza di isolamento, di *Salmonella* 4,[5],12:i:- (8,5% nel 2006, 3,5% nel 2007 e 5,7% nel 2008). Nello corso del triennio considerato è da segnalare l'aumento del numero di isolati di *S. Hadar* (0,2%-0,8%-4,7%). Nei campioni di origine veterinaria (animali e alimenti), i sierotipi più frequentemente isolati sono stati *S. Typhimurium* e *S. Derby*. *S. Typhimurium* nel 2008 si conferma, come negli anni precedenti (29,3% nel 2006 e 16,4% nel 2007), il sierotipo prevalente negli animali (20,0%) seguito da *S. Livingstone* (8,7%) e da *S. Derby* (7,8%). Negli alimenti di origine animale i sierotipi più frequentemente isolati nel 2007 e nel 2008 sono risultati *S. Typhimurium* (25,4% e 29,4% rispettivamente) e *S. Derby* (17,9% e 20,6% rispettivamente), situazione capovolta nel 2006 quando, il sierotipo più isolato è risultato *S. Derby* (22,9%) con la quasi totalità dei ceppi provenienti da prodotti di origine suina, seguito da *S. Typhimurium* (22,9%). La presenza di *Salmonella* 4,[5],12:i:- negli animali diminuisce progressivamente fino ad arrivare nel 2008 ad una percentuale di frequenza di isolamento pari 0,9% con un unico isolamento (1,2% nel 2007 con 2 isolamenti e 1,7% nel 2006 con 3 isolamenti). Negli alimenti di origine animale il medesimo sierotipo ha fatto registrare 9 isolamenti nel 2006 (9,4%), 4 nel 2007 (6%), e nessuno nel 2008.

## **P31 ANALISI DEI PULSOTIPI STYMXB E SENTXB CIRCOLANTI IN UMBRIA NEL BIENNIO 2007-2008**

Alessia Zicavo (a), Anna Maria Dionisi (b), Viviana Bazzucchi (a), Stefania Scuota (a)  
(a) *Laboratorio di Riferimento Regionale Enteropatogeni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*  
(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Nel biennio considerato il numero totale di isolati di origine umana appartenenti ai sierotipi *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e al sierotipo 4,5,12:i:- è risultato pari a 361.

I ceppi batterici sono stati sottoposti a PFGE come da protocollo *Pulse-net*, analizzati mediante il software Bionumerics e a ciascun profilo è stata assegnata una codifica secondo la nomenclatura internazionale (STYMXB.0000 e SENTXB.0000). I pulsotipi appartenenti ai serovar *Typhimurium* e 4,5,12:i:- vengono classificati nel sistema *Pulse-net* alla stessa stregua, in quanto è ormai provata la loro origine clonale.

L'analisi dei pulsotipi di questi serovar ha confermato la presenza stabile sul territorio umbro di alcuni pulsotipi in modo sovrapponibile alla loro distribuzione in altre zone d'Italia; dall'altro ha evidenziato l'emergere di pulsotipi finora meno descritti.

Il pulsotipo STYMXB.0079, in linea con gli anni precedenti, rappresenta da solo quasi la metà dei pulsotipi circolanti. L'altra metà circa è costituita da pulsotipi presenti in modo sporadico sul nostro territorio (STYMXB.0102, 0115, 0233, 0260, 0339, ecc.) oppure non ancora codificati dal sistema *Pulse-net*. Altri pulsotipi sono presenti abitualmente (STYMXB.0061, 0067), ma in misura comunque molto minore.

Da evidenziare la circolazione di un pulsotipo "nuovo" sul territorio italiano, STYMXB.0053, con profilo R-type AmSuTSxt, emerso in modo consistente solo in seguito ad una tossinfezione alimentare verificatasi nella zona di Perugia nel luglio 2007. Dal momento che il medesimo pulsotipo è stato descritto relativamente a ceppi di *Salmonella Typhimurium* isolati da suini nel corso dell'anno, è legittimo ipotizzare la carne suina, alimento presente tra l'altro in modo consistente sulle tavole umbre, come possibile fonte di contagio. Tale pulsotipo è stato descritto in precedenza sul territorio nazionale soltanto una volta nel Nord Italia nel 2005 e una a Roma nel 2009; nell'anno 2008 in Umbria non sono stati notificati ceppi umani appartenenti a questo pulsotipo.

Merita attenzione l'incremento della presenza del pulsotipo STYM.0131, confermato anche dai dati preliminari del 2009, che in Italia era piuttosto raro fino a un paio di anni fa.

Per quanto riguarda *Salmonella Enteritidis* il pulsotipo SENTXB.0001 rappresenta circa la metà dei pulsotipi ed appare in sostanziale aumento rispetto al triennio precedente, mentre il pulsotipo SENTXB.0005 appare in diminuzione rispetto al medesimo periodo. Per gli altri pulsotipi di *S. Enteritidis* non si notano sostanziali differenze.

## **P32 FOOD-BORNE DISEASE DA YERSINIA ENTEROCOLITICA**

Tiziana Zottola, Pina Briganti, Evelina Cuoco, Linda D'Amici, Loredana Guzzon, Gabriella Proietti, Renato Ugo Condoleo

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Latina*

**Introduzione.** *Y. enterocolitica* è responsabile di gastroenterite nell'uomo ed è stata isolata da acqua, alimenti di origine animale e vegetale. Sebbene vi siano in natura più di 70 sierotipi, i ceppi più frequentemente associati a tossinfezione alimentare appartengono ai sierotipi O:3; O:5,27; O:8; O:9. Il suino è il principale serbatoio degli stipiti patogeni di *Yersinia enterocolitica*. Si descrive un episodio di *food-borne disease* occorso in provincia di Latina, nel Lazio, nel gennaio 2008 conseguente al consumo di seppioline congelate provenienti dalla Thailandia. L'alimento è stato campionato dai Carabinieri NAS in seguito alla denuncia di una signora che ha accusato dopo il consumo dell'alimento, forti dolori addominali, scariche diarroiche, mal di reni, durati diversi giorni. Nell'episodio sono rimaste coinvolte due persone, una terza che ha partecipato alla cena e non ha mangiato l'alimento non ha presentato alcun malore.

**Metodi.** Presso il nostro laboratorio sono pervenuti n. 3 campioni di seppioline congelate, il primo costituito dal residuo della confezione aperta e consumata, gli altri due erano confezioni integre della stessa marca e provenienza ma lotto di produzione diverso. I campioni sono stati sottoposti alla ricerca di Stafilococchi coagulasi positivi, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.*, Clostridi solfito-riduttori, *Yersinia enterocolitica* effettuata utilizzando metodi UNI EN ISO. Sono state pure ricercate le biotossine algali DSP e PSD.

**Risultati.** Dalla confezione utilizzata per la preparazione della pietanza ingerita, sono state isolate *Yersinia enterocolitica* e *Klebsiella ornithinolytica*. Dalle due confezioni integre, nella prima sono state isolate *Y. enterocolitica* e *Klebsiella ornithinolytica*, nella seconda *Serratia marcescens*. Gli altri microorganismi sono risultati assenti o in quantità inferiore alla sensibilità del metodo, come pure le biotossine algali. I due ceppi di *Y. enterocolitica* risultavano appartenere al biovar 1A e non agglutinanti i sieri polivalente gruppo O:1 e O:2; O:3; O:5; O:8; O:9. La tecnica della PCR non ha evidenziato il gene cromosomico *ail*, rilevabile solo nei ceppi virulenti. A distanza di circa due mesi dall'episodio, sono stati effettuati, con frequenza settimanale, n. 3 controlli batteriologici delle feci di una delle due persone ammalatisi poiché presentava ancora dolorabilità addominale. Negativi i Risultati.

**Conclusioni.** I ceppi di *Y. enterocolitica* isolati risultano di origine ambientale, non virulenti e non appartenenti ai sierotipi che oggi circolano in Europa. Eppure, l'ingestione dell'alimento contaminato ha provocato una sintomatologia perfettamente sovrapponibile a quella tipica del microrganismo. Si ritiene necessario approfondire gli studi sulla patogenicità dei ceppi di origine asiatica.



## INDICE DEGLI AUTORI

Accogli, M.; 17  
Alborali, L.G.; 44  
Alfieri, R.; 26  
Alio, V.; 28  
Amar, C.; 72  
Anniballi, F.; 33  
Arena, S.; 5; 37  
Aulicino, F.A.; 38  
Auricchio, B.; 33  
Aurigemma, C.; 12  
Babsa, S.; 66  
Baldinelli, F.; 14; 18; 66  
Baldoni, R.; 26  
Balocchini, E.; 23  
Barbaro, A.; 20; 68  
Barco, L.; 6; 60; 62  
Bazzucchi, V.; 67; 74  
Benedetti, I.; 5; 37  
Bertasi, B.; 44  
Bertolassi, R.; 30; 32; 49  
Bianchi, D.M.; 21  
Bifulchi, S.; 33  
Bilei, S.; 62; 73  
Blasior, P.; 71  
Boccia, A.; 12  
Bonanno, C.; 54  
Boni, P.; 10; 30; 32; 44; 49  
Bonometti, E.; 30; 52  
Bove, D.; 26  
Brichese, M.; 60  
Briganti, P.; 75  
Bruè, D.; 40  
Bruno, R.; 21  
Busani, L.; 24; 43  
Busia, G.; 25  
Caligiuri, V.; 26; 38  
Canepari, A.; 50  
Cannistrà, V.; 27  
Canonico, C.; 53  
Canova, A.; 68  
Capezzone, G.; 40  
Caprioli, A.; 4; 14; 18; 24; 37; 43; 66  
Capuano, F.; 38  
Caracappa, S.; 29  
Carattoli, A.; 17  
Cardamone, C.; 28  
Caroli, D.; 7  
Carullo, M.R.; 26; 62  
Casadei, A.; 7  
Casalinuovo, F.; 27  
Cerquetti, M.; 17  
Chiavacci, L.; 20  
Chiesa, F.; 42  
Cibin, V.; 6; 60; 62  
Cirillo, G.; 7  
Colavita, G.; 42  
Condoleo, R.U.; 75  
Conter, M.; 35  
Corea, M.; 27  
Costa, A.; 28; 29  
Costanzi, C.; 52  
Costanzo, C.; 35  
Crotti, S.; 47  
Cuoco, E.; 75  
D'Amici, L.; 75  
D'Argento, C.L.; 27  
D'Orio, V.; 35  
Dalla Pozza, M.C.; 21; 60  
Daminelli, P.; 30; 32; 49; 52  
De Berardinis, F.; 30  
De Cesare, A.; 31  
Dé Cillà, M.; 46  
De Giuli, S.; 46  
De Giusti, M.; 12; 38  
De Medici, D.; 33; 38  
De Nadai, V.; 32  
De Palma, D.; 42  
Decastelli, L.; 20; 21; 62  
Delibato, E.; 33; 38  
Di Bartolo, I.; 34  
Di Ciccio, P.; 35  
Di Giampietro, G.; 73  
Di Gioia, S.; 21  
Di Noto, A.M.; 28; 29

Di Pasquale, S.; 38  
 Digiannatale, E.; 62  
 Dini, W.; 68  
 Dionisi, A.M.; 5; 24; 36; 37; 43; 45; 47;  
 74  
 Droetto, A.; 68  
 Ducoli, S.; 52  
 Durante, G.; 38  
 Duranti, A.; 18; 40  
 Ercolini, C.; 68; 70  
 Escher, M.; 14; 18; 66  
 Fabbi, M.; 41  
 Fanelli, I.; 64  
 Farina, C.; 58  
 Fazio, G.; 68  
 Festino, A.R.; 35  
 Filetici, E.; 5; 33; 37  
 Finazzi, G.; 30; 32; 49; 52  
 Fisichella, S.; 36; 40  
 Foltran, F.; 21  
 Fortini, D.; 17  
 Fraccalvieri, R.; 56  
 Franco, A.; 56  
 Gallina, S.; 20; 21  
 Gallocchio, L.; 31  
 García-Fernández, A.; 17  
 Garofalo, G.; 50  
 Giaccone, V.; 42  
 Gibelli, M.; 58  
 Giufrè, M.; 17  
 Goffredo, E.; 62  
 Grant, K.; 72  
 Graziani, C.; 24; 37; 43; 66  
 Guarino, A.; 26  
 Guzzon, L.; 75  
 Ianieri, A.; 35  
 Iovane, G.; 26  
 Ketì, A.; 60  
 Lasio, L.; 25  
 Latorre, L.; 54; 56  
 Lavazza, A.; 44  
 Lena, R.; 38  
 Leoni, F.; 53  
 Lettini, A.A.; 60  
 Liguori, G.; 26  
 Losio, M.N.; 34; 44; 70  
 Lucarelli, C.; 5; 36; 37; 45  
 Luzzago, C.; 46  
 Luzzi, I.; 5; 7; 17; 24; 33; 36; 37; 38; 43;  
 45; 54  
 Magistrali, C.; 47  
 Magliola, R.; 9; 21  
 Mancin, M.; 60; 62  
 Mancini, L.; 38  
 Manfreda, G.; 31  
 Manuppella, A.; 7  
 Marafin, E.; 60  
 Maresca, C.; 47  
 Marinelli, L.; 12  
 Marrocco, M.G.; 73  
 Marziano, M.L.; 18; 66  
 Masini, L.; 53  
 Matè, G.; 40  
 Mazza, R.; 25  
 Mazzette, R.; 25  
 Melillo, R.; 25  
 Meloni, D.; 25  
 Mercogliano, F.; 64  
 Merlo, L.M.; 41  
 Messeri, D.; 41  
 Michelacci, V.; 66  
 Migliazzo, A.; 29  
 Minelli, F.; 18; 66  
 Minorello, C.; 60  
 Mioni, R.; 31; 38  
 Miotti Scapin, R.; 42  
 Miraglia, V.; 49  
 Molina, M.; 7  
 Monastero, P.; 49  
 Monini, M.; 34  
 Morabito, S.; 66  
 Moro, E.; 44  
 Mulas, M.; 25  
 Mupo, M.; 71  
 Mureddu, A.; 25  
 Musarella, R.; 27  
 Neri, M.C.; 47  
 Nervi, G.; 50  
 Normanno, G.; 54; 56  
 Oliverio, E.; 52  
 Orlandi, M.; 68  
 Ottaviani, D.; 53

Owczarek, S.; 5; 33; 36; 37; 45  
 Palazzo, C.; 12  
 Palmero, S.; 68  
 Paludi, D.; 35  
 Palumbo, P.; 29  
 Parisi, A.; 54; 56  
 Parlato, Al.; 26  
 Parlato, An.; 26  
 Passatempo, R.; 40  
 Pavoletti, E.; 42  
 Pavoni, E.; 34; 44; 70  
 Pecoraro, C.; 66  
 Perelli, G.; 41  
 Perin, S.; 58  
 Pezzotti, G.; 47  
 Picciolli, P.; 23  
 Picotto, P.; 38  
 Pierozzi, C.; 23; 41; 59  
 Piraino, C.; 62  
 Pittaluga, M.; 50  
 Podestà, A.; 58  
 Poirè, G.; 68  
 Pontello, M.; 72  
 Potenziani, S.; 53  
 Proietti, G.; 75  
 Proroga, Y.T.R.; 26  
 Radu, I.; 42  
 Ramon, E.; 60  
 Rezza, G.; 3  
 Ricci, A.; 6; 60; 62  
 Ripabelli, G.; 64; 72  
 Rippa, P.; 27  
 Risiglione, R.; 21  
 Riverson, C.; 27  
 Rocchegiani, E.; 53  
 Romanin, E.; 71  
 Rossini, I.; 70  
 Ruggeri, F.M.; 13; 34  
 Russello, G.; 58  
 Russo, S.; 21; 26  
 Saccardin, C.; 60  
 Sammarco, M.L.; 64; 72  
 Santagada, G.; 54; 56  
 Santarelli, S.; 53  
 Scavia, G.; 14; 18; 66  
 Scenati, R.; 38  
 Scoccia, E.; 47  
 Scuota, S.; 7; 47; 53; 62; 67; 74  
 Secco, E.; 68  
 Seeber, M.; 71  
 Serracca, L.; 68; 70  
 Spitaler, G.; 71  
 Staffolani, M.; 7; 18; 36; 40; 62  
 Stenico, A.; 7; 71  
 Tagliabue, S.; 62  
 Talini, M.; 41; 59  
 Tamburo, M.; 64; 72  
 Tentellini, M.; 47  
 Tiberti, D.; 50  
 Todeschi, S.; 49  
 Tolli, R.; 73  
 Toti, L.; 33; 38  
 Tozzoli, R.; 66  
 Tufi, D.; 12  
 Valli, M.B.; 36  
 Vercellotti, L.; 42  
 Vergara, A.; 35  
 Vicari, N.; 41  
 Vidili, A.; 62  
 Villa, L.; 45  
 Vio, P.; 60  
 Vitullo, M.; 64  
 Wanderlingh, W.; 41; 59  
 Zanoni, M.; 44  
 Zavagnin, P.; 60  
 Zicavo, A.; 47; 67; 74  
 Zinno, V.; 26  
 Zottola, T.; 75

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

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, ottobre-dicembre 2009 (n.4) 1° Suppl.*