



Listeriosi in gravidanza e neonatale: indagini epidemiologiche, di laboratorio, criticità e riflessioni

I Laboratori Nazionali di Riferimento *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes*

Teramo, 15-16 dicembre 2015

Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi"

Dott.ssa Selene Marozzi



selene.marozzi@izslt.it

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana ,
M. Aleandri, via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma (Capannelle),
Tel 0679099340



Qualche dato....

- Secondo alcune stime il 99% dei casi di Listeriosi è attribuibile al consumo di alimenti contaminati (Mead et. al., 1999)
- La listeriosi è un grave problema di sanità pubblica in conseguenza della sua gravità: mortalità elevata (**20-30%**) (Lomonaco et al., 2015)
- L'incidenza non è elevata ma in aumento in Europa; nel mondo variabile da 1 a 10 casi per 1000.000 abitanti; in Europa **0.4 casi per 100.000 abitanti nel 2012** (EFSA/ECDC, 2014)
- E' stato calcolato negli Stati Uniti che, nel solo 2012, i costi totali annui correlati ai casi di listeriosi (cioè le spese mediche, diminuzione della produttività, la morte prematura) sono stati di 2,6 miliardi di dollari
- *L. monocytogenes* rappresenta un rischio elevato per alcuni gruppi specifici della popolazione ovvero gli anziani, i soggetti immunodepressi, **le donne in gravidanza ed i loro neonati**



- Le malattie da *L. monocytogenes* nelle donne gravide sono **18 volte più frequenti** (12/100.000) che nel resto della popolazione (0,7/100.000).
- L'epidemia più grande di Listeriosi che ha coinvolto un gran numero di donne in gravidanza (65.5% del totale ammalati ovvero n=142) si è verificata a nel 1985 in California, USA (Los Angeles). Epidemia dovuta al consumo di Mexican-style cheese
- Uno studio condotto dal WHO (2004) in 20 Paesi ha dimostrato che su 782 casi di listeriosi il 43% delle infezioni era riconducibile a pazienti in stato di gravidanza. Ricerche più recenti, invece, hanno dimostrato che i casi di listeriosi gravida sono rispetto al totale, **l'11% in Italia, il 12% nel Regno Unito, il 16.9% negli Stati Uniti ed il 17.7 % in Francia** (Soni et al., 2015)
- In molti casi le donne sono asintomatiche. La febbre è il sintomo principale (Janakiraman, 2008)



Table 1
Symptoms of Listeriosis

Symptom	Number of Patients	Percentage
Fever	126	65
Flu-like syndrome	61	32
Abdominal or back pain	41	21.5
Vomiting/diarrhea	14	7
Headache	20	10.5
Myalgia	8	4
Sore throat	7	4
None	55	29

Data from 191 cases reviewed by Mylonakis and colleagues.³ Patients may have more than 1 symptom.



- La listeriosi può comparire indifferentemente **in tutto il periodo gravidico** con un aumento della suscettibilità negli stadi più tardivi
- il **periodo di incubazione** nelle donne gravide risulta generalmente più lungo (**17-67 giorni** vs 1-67 giorni). Nei casi di gastroenterite il periodo di incubazione è in media di 24 ore (da 6 a 240 ore) (Goulet et al., 2013).

•La trasmissione diretta al neonato è possibile ma rara. Una donna incinta può trasmettere l'infezione al feto in utero per **via trans placentare** o durante il passaggio nel canale del parto (ANSES,2011). *L. monocytogenes* mostra un particolare tropismo per utero e placenta (Mateus et al., 2013)

•Alla trasmissione transplacentare possono fare seguito l'aborto, la nascita prematura o l'infezione del neonato

•L'incidenza di listeriosi nei neonati è circa pari a **8.6 casi per 100.000 nati vivi**

•Nel 2012 in Europa il tasso di notifica più elevato si è avuto nei soggetti di età <1 anno o > 85 anni





Nel gennaio 2014 sono stati inviati **da una struttura sanitaria pubblica di Roma** al Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (CREP) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT), **3 ceppi batterici di *L. monocytogenes* isolati da altrettanti pazienti**

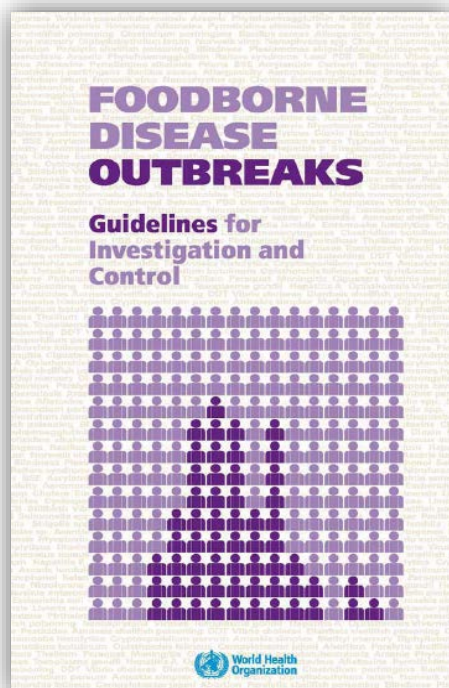
L'isolamento era stato ottenuto dal sangue di **due neonati** e **dai lochi vaginali di una delle madri**. La diagnosi di listeriosi era stata emessa per la madre e per il figlio rispettivamente in data 14/01/2014 e 08/01/2014, mentre per il secondo neonato il 24/12/2013.



L'isolamento in un arco temporale ravvicinato di 3 ceppi di *L. monocytogenes* nel medesimo presidio ospedaliero ha reso necessaria una indagine approfondita, al fine di identificare o escludere eventuali correlazioni tra i casi.

Normalmente un ricerca completa, quando si sospetta un focolaio di malattia trasmessa dagli alimenti, dovrebbe comprendere :

- Indagini epidemiologiche,
- Indagini ambientali e alimentari,
- Indagini di laboratorio



3.4 Interpreting data sources	12
Section 4. Investigation of foodborne disease outbreaks	14
4.1 General	14
4.2 Epidemiological investigations	14
4.3 Environmental and food investigations	36
4.4 Laboratory investigations	43
Section 5. Control measures	47





MATERIALI E METODI

ANALISI DI LABORATORIO (1)

IDENTIFICAZIONE SIEROLOGIA E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI :

Sono state eseguite



1. la determinazione degli **antigeni somatici (O) e flagellari (H)** (con kit Listeria Antisera SEIKEN (DENNKA SEIKEN CO. Ltd, Tokyo, Giappone)
2. la tipizzazione molecolare mediante **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)** secondo il protocollo standardizzato PulseNet (**CDC, 2009**).



INDAGINE EPIDEMIOLOGICA, AMBIENTALE ED ALIMENTARE:



Contemporaneamente alle indagini di laboratorio, sono stati condotti dalla ASL RM/B alla quale afferisce la struttura sanitaria di invio dei ceppi, gli accertamenti epidemiologici, ambientali ed alimentari. In seguito agli stessi è emerso che:



La donna risultata positiva per *Listeria*, aveva consumato qualche settimana prima del parto, avvenuto pre-termine (34esima settimana e 3 gg), alcuni alimenti a rischio per la presenza di *L. monocytogenes* ovvero:

STRACCHINO

GORGONZOLA

SALMONE AFFUMICATO

tutti acquistati in un esercizio di vendita al dettaglio della grande distribuzione.



la donna riferiva la marca dello stracchino ma non quella del gorgonzola e del salmone affumicato, tuttavia per quanto concerne quest'ultimo ricordava chiaramente la tipologia (dimensioni, colore delle scritte e delle stampe) della confezione.

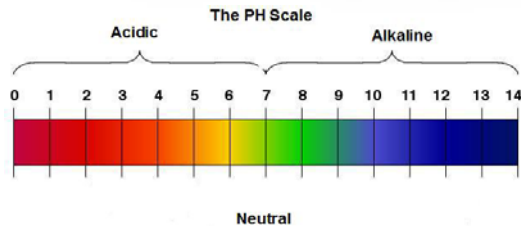
E' stato quindi prelevato un campione reperto di **Salmone affumicato** che, per packaging, presentava le caratteristiche descritte dalla donna.

ANALISI DI LABORATORIO (2)

Sullo stesso sono state condotte le seguenti analisi di laboratorio:

$$a_w \equiv p/p_0$$

determinazione dell' a_w , (ISO 21807:2004)



valutazione del pH (metodo MFHPB 03:2012)



esame colturale qualitativo e quantitativo per la ricerca di *L. monocytogenes* (UNI EN ISO 11290: 2005 parte 1 e 2)



identificazione sierologica ceppi isolati mediante sieroagglutinazione (kit Listeria Antisera SEIKEN (DENNKA SEIKEN CO. Ltd, Tokyo, Giappone) e tipizzazione molecolare mediante PFGE (protocollo standardizzato PulseNet CDC, 2009)



- *Che cosa è emerso???*

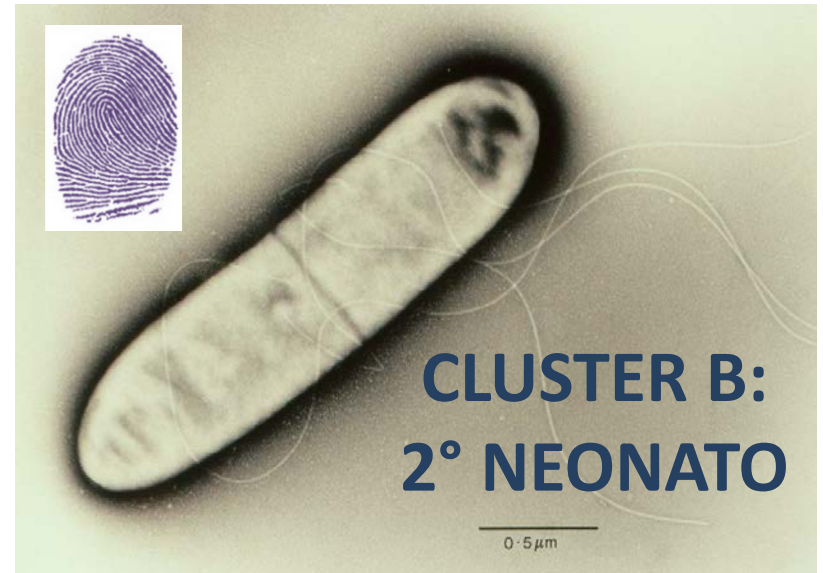




La sierotipizzazione ha consentito di attribuire
tutti i **3 ceppi umani** al



La tipizzazione molecolare con PFGE ha invece evidenziato l'appartenenza a **due cluster differenti ovvero cluster A per gli isolati da madre e figlio e cluster B per quello ottenuto dal secondo neonato**



CAMPIONE REPERTO DI SALMONE AFFUMICATO

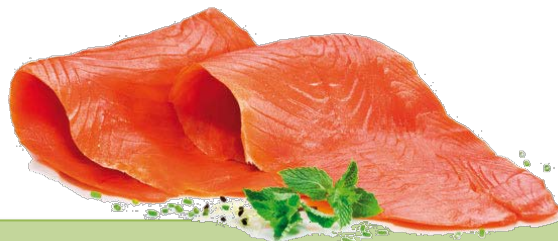


TABELLA 1. RISULTATI DELLE ANALIS CONDOTTE SUL CAMPIONE REPERTO DI SALMONE AFFUMICATO

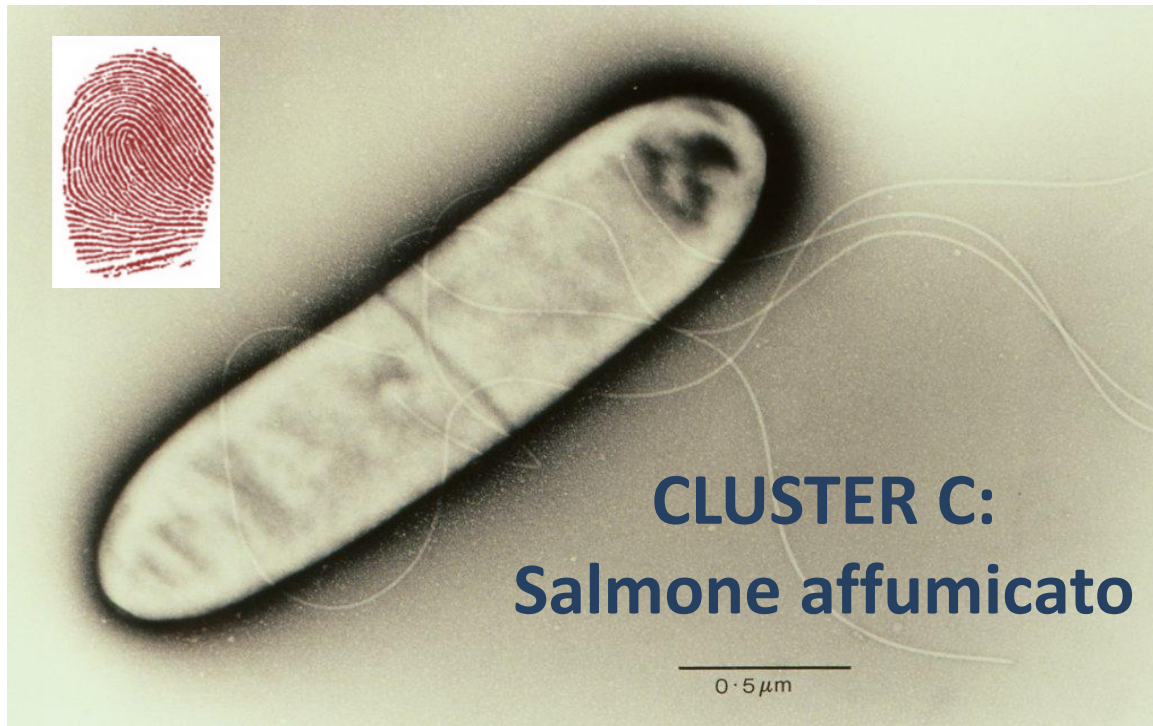
UNITÀ CAMPIONARIA	a _w	pH	<i>L. monocytogenes</i>	
			QUANTITATIVO	QUALITATIVO
1	0.972	5.9	< 10 ufc/g	PRESENTE IN 25 G
2	0.966	6.0	< 10 ufc/g	PRESENTE IN 25 G
3	0.979	6.0	< 10 ufc/g	PRESENTE IN 25 G
4	0.967	6.0	4.5x10 ¹ ufc/g	PRESENTE IN 25 G
5	0.975	6.0	< 10 ufc/g	ASSENTE IN 25 G

sono risultate contaminate da *L. monocytogenes* 4 U.C. su 5 testate all'esame qualitativo ed 1 U.C. su 5 all'esame quantitativo con valori di 4,5x10 ufc/g.

- La sierotipizzazione ha consentito di attribuire tutti i ceppi isolati dall'alimento al



la tipizzazione molecolare, ha evidenziato in tutte le U.C. positive un ulteriore cluster diverso da quelli di appartenenza degli isolati umani.



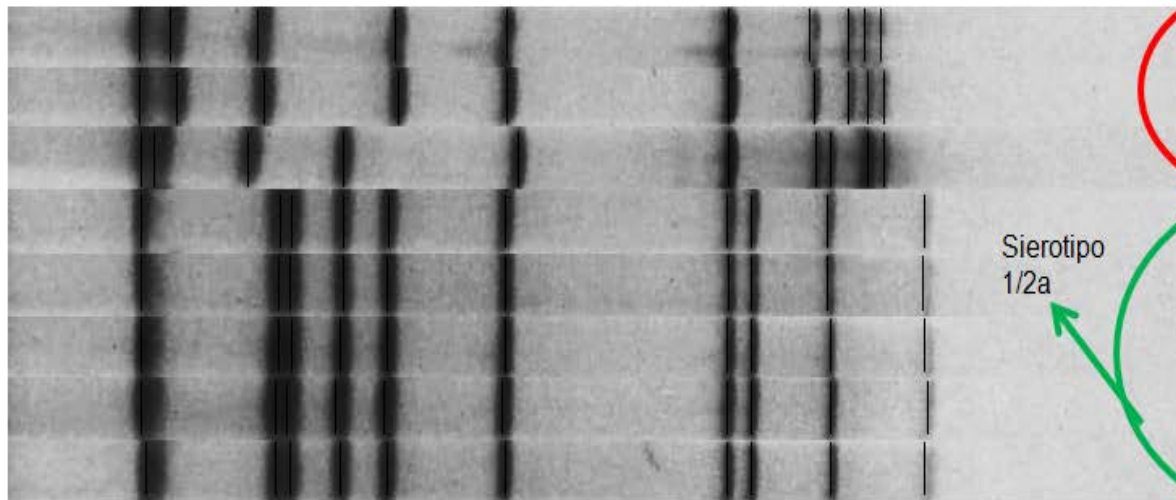
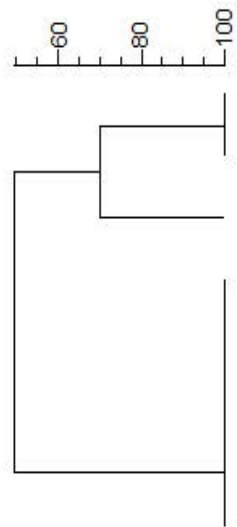
PFGE

Dice (Opt: 1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

ListeriaAcsl

ListeriaAcsl

Sierotipo 4b



madre

figlio

2° neonato

Salmone / ceppo 1

Salmone / ceppo 2

Salmone / ceppo 3

Salmone / ceppo 4

Salmone / ceppo 5

Sierotipo 1/2a

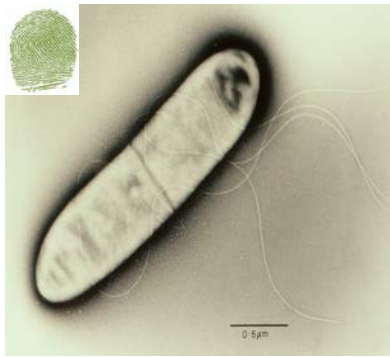


Conclusioni

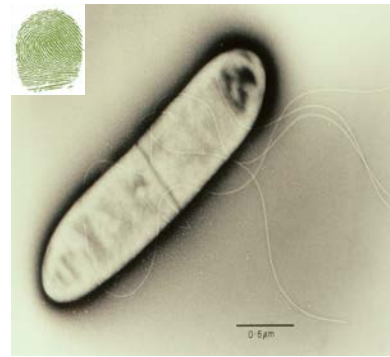
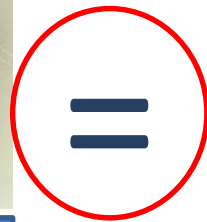
.....



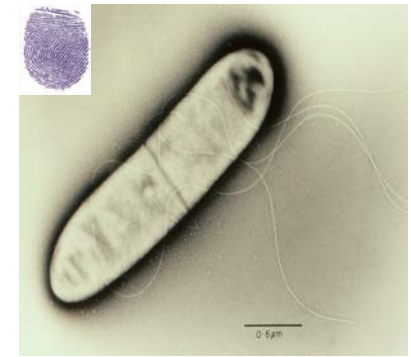
- Come evidenziato dalla presenza di due differenti fingerprinting ottenuti con PFGE, non è stata rilevata una correlazione tra i due casi di listeriosi neonatale pur avendo la sierotipizzazione rilevato l'appartenenza dei tre ceppi al medesimo sierotipo 4b.



madre



figlio



2° neonato



- Si riconoscono diversi sierotipi di *L. monocytogenes*, tuttavia i sierotipi **1/2 a**, **1/2 b**, e **4b** sono coinvolti nella maggior parte dei casi di listeriosi
- Alcuni Autori hanno evidenziato una correlazione tra sierotipi e quadro clinico della malattia, in particolare il sierotipo 4b è stato associato alle listeriosi gravidiche (McLauchlin, 1990).
- L'incidenza del sierotipo 4b nei casi di Listeriosi varia dal 50 al 70% e tende ad essere più elevata negli episodi perinatali (Katarihou, 2002).



- Per quanto riguarda invece i ceppi isolati dal campione reperto di salmone affumicato, l'appartenenza al sierotipo 1/2 a ha escluso ogni correlazione tra i casi umani ed il consumo dell'alimento.





- Nella UE il Regolamento 2073/2005 e successive modifiche ed integrazioni, ha ampliato il campo di tolleranza per i RTE sino a valori di **100 ufc/g**. Tuttavia, questo limite viene applicato solo se il produttore è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'Autorità Competente, che l'alimento non supera tale soglia al termine della shelf-life. **Da un punto di vista legale il campione reperto di salmone affumicato era conforme alle disposizioni vigenti in materia, così come avvalorato dai Servizi Veterinari competenti per territorio, che hanno visionato la documentazione prodotta dalla ditta**



Tuttavia sono doverose alcune osservazioni :

- non è stato possibile rintracciare il lotto di produzione del salmone affumicato consumato dalla madre tuttavia si può ragionevolmente presupporre che il sierotipo “circolante” in quella azienda sia l'1/2 a (contaminazione >ambientale!!!)



- **E i formaggi??????**



la corretta identificazione dell'alimento veicolo di tossinfezione, avrebbe dovuto implicare il campionamento dei due formaggi che la donna riferiva di aver consumato (stracchino e gorgonzola). Come è noto, infatti, **i formaggi figurano tra gli alimenti a maggior frequenza di positività** (EFSA, 2104) e sono, di conseguenza, chiamati in causa in numerosi episodi epidemici e sporadici di tossinfezione alimentare. Non è da escludere a priori, pertanto, che questi fossero coinvolti nella trasmissione del microrganismo.



- il periodo di incubazione nelle donne gravide risulta generalmente più lungo (**17-67 giorni** vs 1-67 giorni)
- limitazione nell'investigazione del caso sporadico riferibile al secondo neonato causata dalla presenza di una indagine giudiziaria in corso. Questa circostanza ha reso gli atti investigativi dei NAS, non consultabili.



T H A N K S

**UN RINGRAZIAMENTO AI COLLEGHI
DEL CREP**

**(Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri
Patogeni) per aver condotto le analisi di laboratorio sui
ceppi**





Thank you for your attention!

