

Langhirano, 09 Aprile 2014

Listeria monocytogenes e *Listeria* spp., biologia, ecologia e rischi per la salute umana

Giuseppe Merialdi DVM, PhD

IZSLER-Bologna



*Listeria: a foodborne pathogen
that knows how to survive*

Listeria spp. E *L. monocytogenes*

- Biologia
- Epidemiologia
- Risposta adattativa agli stress ambientali
- La malattia nell'uomo e negli animali
- Incidenza della Listeriosi: report EFSA 2013

Listeriosi

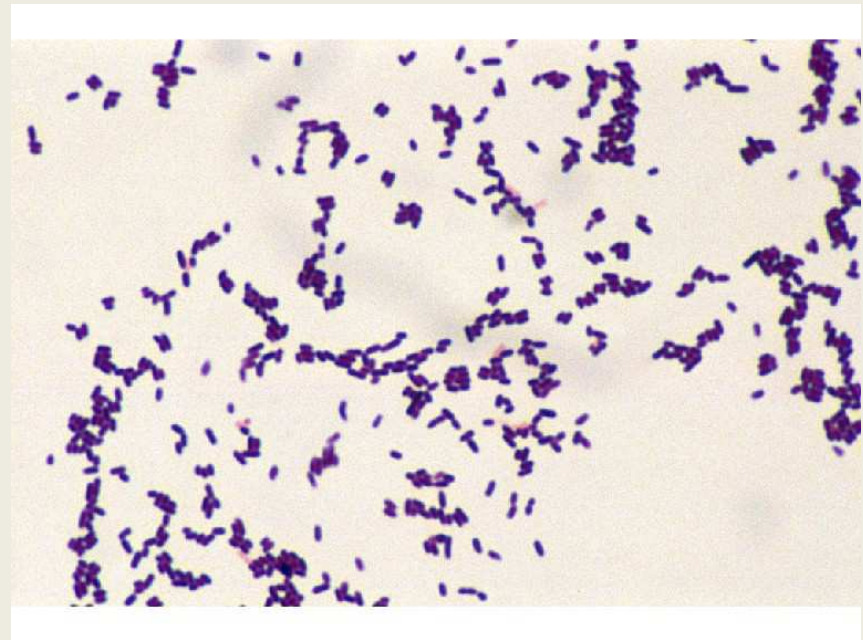
- Diagnosticata per la prima volta nel 1926 come causa di monocitosi in animali da laboratorio
- Segnalata ripetutamente in varie specie animali ma scarsamente considerata
- Importanti focolai epidemici negli anni 80 in America del Nord e Europa
 - Cavolo cappuccio, patè, formaggio fresco

Biologia

- Listeria genere: 10 specie
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Listeria ivanovi*
 - *L. fleischmannii*
 - *Listeria innocua*
 - *Listeria seeligeri*
 - *Listeria welshimeri*
 - *Listeria grayi*
 - *L. marthii*
 - *L. rocourtia*
 - *L. weihenstephanensis*

Biologia

- Bacilli gram positivi
- Parassiti intracellulari facoltativi



Biologia

- *Listeria monocytogenes* sierotipi

- 1/2a, 1/2b, 1/2c

- 3a, 3b, 3c

- 4a, 4b, 4c, 4d, 4e

- 7

98% dei casi clinici umani

Biologia

- Temperatura ottimale crescita 30°C
 - Range vastissimo (-0,15°C a 45°C)
- $a_w > 0,92$
- NaCl 10%
- pH 4,3-9,4
- D a 60°C da 16,7 a 1,3 minuti
- D a 70°C da 0,2 a 0,06 minuti

Ecologia

- Ampiamente diffuse
 - Ambiente, vegetali
 - Animali
 - Uomo
 - Alimenti

Epidemiologia:ambiente

- Acque
 - Raramente isolata da acque sorgive o acque di mare non inquinate
 - Frequente isolamento da:
 - Acque di fiume, baie, fogne, scarichi industriali e zootecnici
 - Acque di allevamenti ittici

Epidemiologia: ambiente

- Suolo
 - Campi coltivati
 - Campi non coltivati
 - Ambiente silvestre
 - Pascoli
- Circa 20% dei campioni di suolo risulta contaminato da *Listeria* spp.

Epidemiologia: ambiente

- Vegetali
- Isolamenti da piante di:
 - Mais
 - Grano
 - Varie altre piante
- Persistenza e crescita come saprofiti nell'interfaccia suolo/vegetali

Epidemiologia:ambiente

- Ambienti di lavoro industrie alimentari
 - Capacità di aderire alle superfici
 - Crescita in biofilms
 - Sierotipi 1/2a, 1/2b e 1/2c maggior adattamento all'industria delle carni

Epidemiologia: animali

- Gli animali si infettano attraverso acque e alimenti contaminati:
 - Insilati e foraggi
- Animali selvatici
 - Cervo (feci) 15% (*L. monocytogenes* e *L. ivanovi*)
 - Volatili (feci) 17% (*L. monocytogenes* e *L. ivanovi*)

Epidemiologia: animali

- Suini domestici (*L. monocytogenes*):
 - feci: 0-47 %
 - tonsille: 0-61%
- Bovini (*L. monocytogenes*):
 - feci: 0-3,4%
- Uomo (*L. monocytogenes*)
 - 1-5% di eliminatori fecali asintomatici
 - In Italia (Ferrara, 1988): 1,5%

Epidemiologia: alimenti

- Prodotti ittici:
 - Rari isolamenti da prodotti della pesca in mare aperto
 - Frequenti da pesce allevato o pescato in acque in vicinanza di insediamenti urbani o zootecnici
 - Aumento del livello di contaminazione lungo il processo produttivo
 - Presenza di ceppi residenti negli stabilimenti

Epidemiologia: alimenti

- Carne di pollo:
 - Elevata frequenza di contaminazione (11-65%)
- Carne suina:
 - Tonsille (0-61%)
 - Lingua (fino a 14%)
 - Carni macinate (45-50%)
 - Prevalenti sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c
 - Presenza di sierotipo 4b
 - Vari casi epidemici: Lingua, hot dogs

Epidemiologia: alimenti

- Carne bovina
 - Livelli decisamente inferiori nei tagli carnei (<10%)
- Agnello:
 - 4% carcasse contaminate
- Coniglio
 - 12% carcasse

Epidemiologia: alimenti

TABELLA 1.
Contaminazione da *L. monocytogenes* nei "prodotti carnei semplici".

SPECIE	N° campioni esaminati	N° campioni positivi (%)	Cfu/g 1-10	Cfu/g 10-100	Cfu/g 100-1000
AVICOLI	176	34 (19,32%)	85,29%	14,71%	0,00%
BOVINO	168	14 (8,33%)	100,00%	0,00%	0,00%
SUINO	179	30 (16,76%)	100,00%	0,00%	0,00%
CONIGLIO	11	0 (0,00%)	0,00%	0,00%	0,00%
EQUINO	13	0 (0,00%)	0,00%	0,00%	0,00%
OVINO	1	0 (0,00%)	0,00%	0,00%	0,00%

Epidemiologia: alimenti

TABELLA 2.
Contaminazione da *L. monocytogenes* nei "prodotti carnei lavorati".

SPECIE	N° campioni esaminati	N° campioni positivi (%)	Cfu/g 1-10	Cfu/g 10-100	Cfu/g 100-1000
AVICOLI	60	33 (55,00%)	72,73%	12,12%	15,15%
BOVINO	43	8 (18,60%)	100,00%	0,00%	0,00%
SUINO	55	13 (23,64%)	91,66%	8,34%	0,00%
MISTO	6	0 (0,00%)	0,00%	0,00%	0,00%
EQUINO	5	0 (0,00%)	0,00%	0,00%	0,00%
OVINO	1	1 (100,00%)	100,00%	0,00%	0,00%
RTE	52	1 (1,92%)	100,00%	0,00%	0,00%

Epidemiologia: alimenti

- Latte e derivati
 - Latte di massa: 2,2-4,9%
 - Mastite subclinica
 - Frequente coinvolgimento in casi epidemici e sporadici:
 - Latte pastorizzato (ricontaminato)
 - Formaggi freschi
 - Formaggi erborinati
 - Latte aromatizzato

Epidemiologia: alimenti

- Frutta e vegetali
 - Percentuali di contaminazione generalmente più bassi rispetto a AOA
 - Casi epidemici importanti:
 - Cavolo cappuccio (Canada, 1981)
 - Insalata di tonno e mais (2007, Italy)
 - Entrambi associati a sierotipo 4b

SCIENTIFIC REPORT OF EFSA

Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates¹

European Food Safety Authority^{2, 3}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

Table 2: Prevalence (%) of *L. monocytogenes*-contaminated packaged smoked or gravad fish samples, at sampling, in the EU,^(a) 2010-2011

Subtype of the fish product	Total No of samples	No of positive of samples	Prevalence (%)	95 % CI
Cold smoked fish	599	104	17.4	14.2 – 21.1
Hot smoked fish	525	33	6.3	4.4 – 8.9
Unknown smoked fish	1 625	143	8.8	7.3 – 10.5
Gravad fish	245	30	12.2	8.7 – 17.0
EU	2 994	310	10.4	9.1 – 11.7

	<i>L. monocytogenes</i> count (cfu/g)							Total
	< 10 ^(b)	10-39	40-100	> 100-1 000	> 1 000-10 000	> 10 000-100 000	> 100 000	
Total No of samples	2 954	28	19	27	12	10	3	3 053
Proportion of samples (%)	96.8	0.9	0.6	0.9	0.4	0.3	0.1	
Proportion of samples amongst 99 samples with at least 10 cfu/g	-(c)	28.3	19.2	27.3	12.1	10.1	3.0	

The EU prevalence of *L. monocytogenes*-contaminated meat products was 2.07 % (CI: 1.63 % - 2.64 %) (72 positive samples out of 3 470), at the end of shelf-life.

The proportion (and number) of meat products samples with a *L. monocytogenes* count exceeding the level of 100 cfu/g was 0.43 % (CI: 0.25 %-0.74 %) (15 samples) at the end of shelf-life.

Table 15: Categorized *L. monocytogenes* counts (cfu/g) present in packaged heat-treated meat product samples, at the end of shelf-life, in the EU,^(a) 2010-2011

	<i>L. monocytogenes</i> count (cfu/g)							Total
	< 10 ^(b)	10-39	40-100	> 100- 1 000	> 1 000- 10 000	> 10 000- 100 000	> 100 000	
Total No of samples	3 498	9	8	12	1	2	0	3 530
Proportion of samples (%)	99.1	0.3	0.2	0.3	0.03	0.1	0	
Proportion of samples among those with at least 10 cfu/g	-(c)	28.1	25.0	37.5	3.1	6.3	0	

The EU prevalence of *L. monocytogenes*-contaminated cheese samples was 0.47 % (CI: 0.29 %-0.77 %) (16 positive samples out of 3 393) at the end of shelf-life.

The proportion (and number) of cheese samples with a *L. monocytogenes* count exceeding the level of 100 cfu/g was 0.06 % (CI: 0.02 %-0.24 %) (2 samples out of 3 393) at the end of shelf-life.

Table 17: Categorical *L. monocytogenes* counts (cfu/g) present in soft or semi-soft cheeses, at the end of shelf-life, in the EU,^(a) 2010-2011

	<i>L. monocytogenes</i> count (cfu/g)							Total
	< 10 ^(b)	10-39	40-100	> 100-1 000	> 1 000-10 000	> 10 000-100 000	> 100 000	
Total No of samples	3 448	1	1	0	1	1	0	3 452
Proportion of samples (%)	99.9	0.03	0.03	0	0.03	0.03	0	
Proportion of samples among those with at least 10 cfu/g	-(c)	25.0	25.0	0	25.0	25.0	0	

Epidemiologia

4

Handbook of *Listeria monocytogenes*

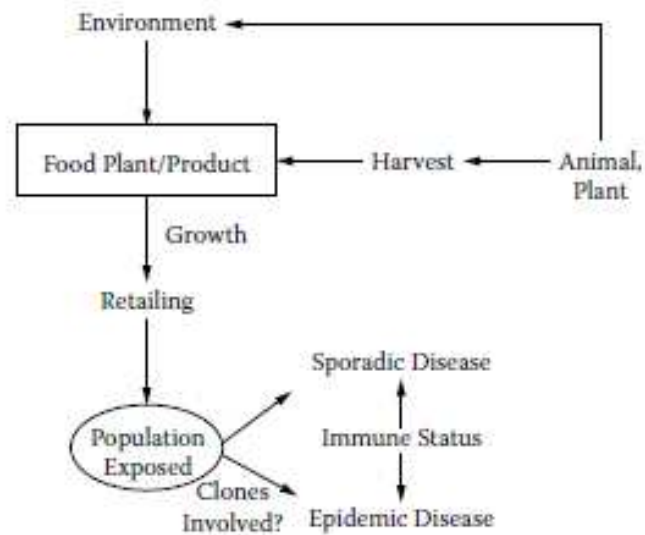


FIGURE 1.1 Ecological interrelationships of *L. monocytogenes*, the environment, food, and cases of listeriosis.

Stress responses

- Durante il suo percorso dall'ambiente all'ospite *L. monocytogenes* incontra numerosi ostacoli
- A tali ostacoli è in grado di rispondere con una serie di sofisticati meccanismi di adattamento

Stress responses

- Nell'ambiente
 - Temperatura
 - Scarsità di nutrimento
 - Disinfettanti
- Negli alimenti
 - Temperature (alte e basse)
 - Acidificazione
 - Disidratazione
 - Salagione
- Nell'ospite
 - pH gastrico
 - Elevata osmolarità intestinale
 - Sali biliare
 - Acidi deboli
 - Competizione trofica
 - Risposta immunitaria aspecifica

Alte temperature

- La temperatura elevata modifica la struttura delle proteine e determina instabilità di membrana e delle macromolecole interne (ribosomi, DNA, enzimi, etc)
- In risposta a questo *L. monocytogenes* è in grado di attivare la cosiddetta *heat shock response*

Alte temperature

- *Heat shock response*
 - Aumento della sintesi di proteine (heat shock proteins)
 - Chaperoni che ricostituiscono la struttura proteica originale alterata dal calore
 - Proteasi ATP dipendenti che degradano le proteine alterate in modo irreparabile

Acidità

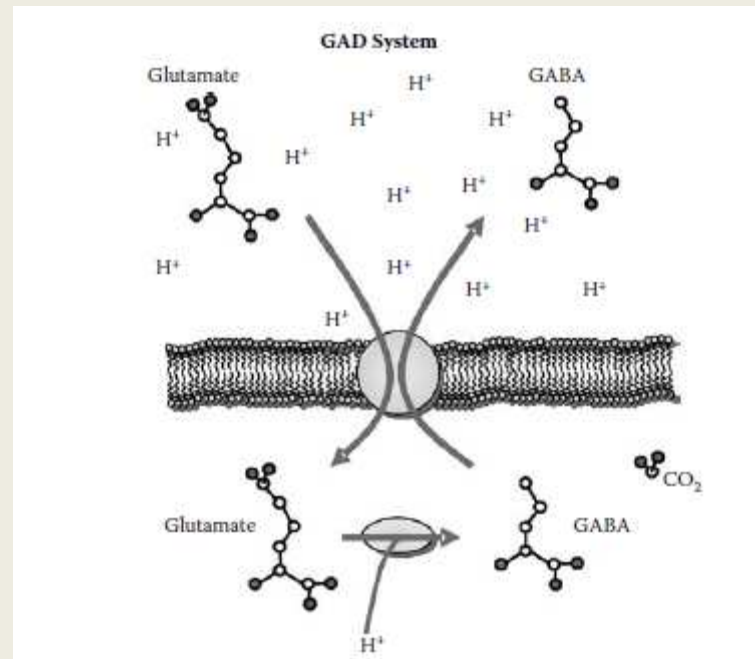
- L'effetto dell'ambiente acido sui batteri è dovuto all'azione combinata di basso pH e presenza di acidi organici
- Gli acidi organici nella loro forma indissociata penetrano attraverso la parete cellulare
- Una volta raggiunto il citoplasma (che ha pH maggiore dell'ambiente esterno) si dissociano e liberano protoni acidificandolo
- Più è basso il pH esterno più il passaggio degli acidi indissociati attraverso la membrana è favorito

Acidità

- *L. monocytogenes* è neutrofila e deve mantenere inalterato il pH citoplasmatico
- Meccanismo di ATR (Acid Tolerance Response)
 - In seguito ad esposizione a una modica diminuzione dell'acidità il meccanismo viene attivato
 - In caso di brusca riduzione (normalmente letale) del pH il microrganismo è in grado di produrre ASPs (Acid shock proteins)

Acidità

- ASPs: esempio glutammato decarbossilasi



Da glutammato a γ-aminoburrato con consumo di un protone

Pressione osmotica

- Aumenti della pressione osmotica ambientale possono essere dovuti a disidratazione e aumento della concentrazione di zucchero o sale
- In queste condizioni si verifica un istantaneo efflusso di acqua dal batterio verso l'esterno con perdita del turgore cellulare e alterazioni del metabolismo anche letali

Pressione osmotica

- In risposta ad una variazione della pressione osmotica *L. monocytogenes* risponde con:
 - Accumolo di soluti compatibili:
 - Piccole molecole organiche che non alterando la funzionalità cellulare sono in grado di trattenere l'acqua. Nel caso di *L. monocytogenes* sono reclutate dall'esterno (es. carnitina da tessuti animali)
 - Sintesi di osmotic stress proteins

La malattia

- La Listeriosi umana è caratterizzata da:
 - Elevato tasso di ospedalizzazione: circa 90%
 - Elevato tasso di mortalità (20-30%)

Forme cliniche

- Feto/materno – neonatale
 - Aborto nell'ultimo trimestre
 - Natimortalità
 - Nascita di neonati affetti da granulomatosi settica fatale
 - Sindrome simil influenzale nella madre nei 15 giorni precedenti
 - Listeriosi perinatale (rara) da 1 a 8 settimane dopo il parto (mortalità inferiore)



Forme cliniche

- Listeriosi nell'adulto:
 - 50-70% coinvolgimento del SNC
 - Meningoencefalite
 - Raramente ascessi cerebrali
 - Batteriemia
 - Possibile forma setticemica
 - Endocardite
 - Polmonite
 - Oftalmite
 - Forma gastro intestinale

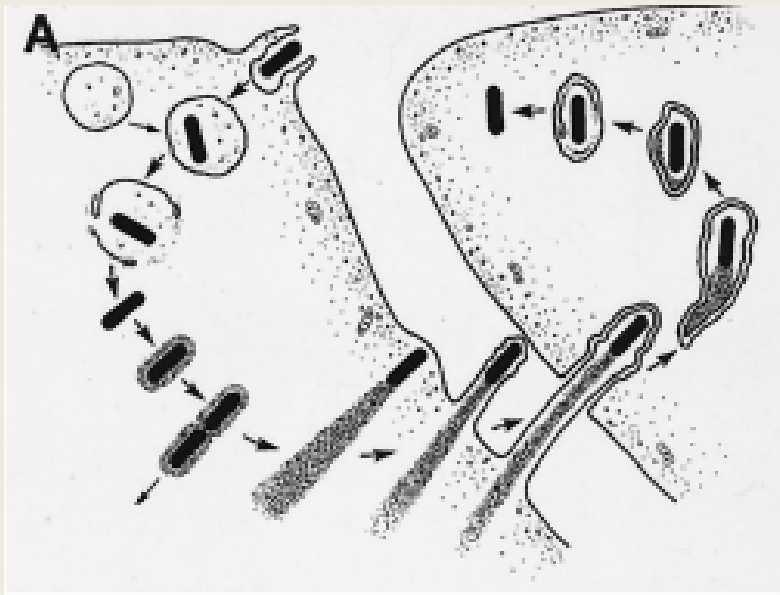
Patogenesi

- 99% dei casi di Listeriosi è conseguente ad assunzione di alimenti contaminati (inclusa trasmissione verticale transplacentare)
- 1% trasmissione diretta cutanea
 - Veterinari
 - Allevatori

Patogenesi

- Superamento barriera gastrica
- Attraversamento muocosa intestinale
 - Invasione degli enterociti per presenza di recettori specifici (uomo e cavia)
 - Fagocitosi da parte delle cellule M delle Placche del Peyer
 - Replicazione nei macrofagi della lamina propria intestinale
 - Trasporto veicolato da cellule dendritiche ai linfonodi mesenterici

Patogenesi



- Induzione fagocitosi (InlA, InlB, p60, ActA)
- Liberazione dal fagosoma (hly, fosfolipasi)
- Filamenti di actina
- Pseudopodi
- Fagocitosi da cellule confinanti

Patogenesis

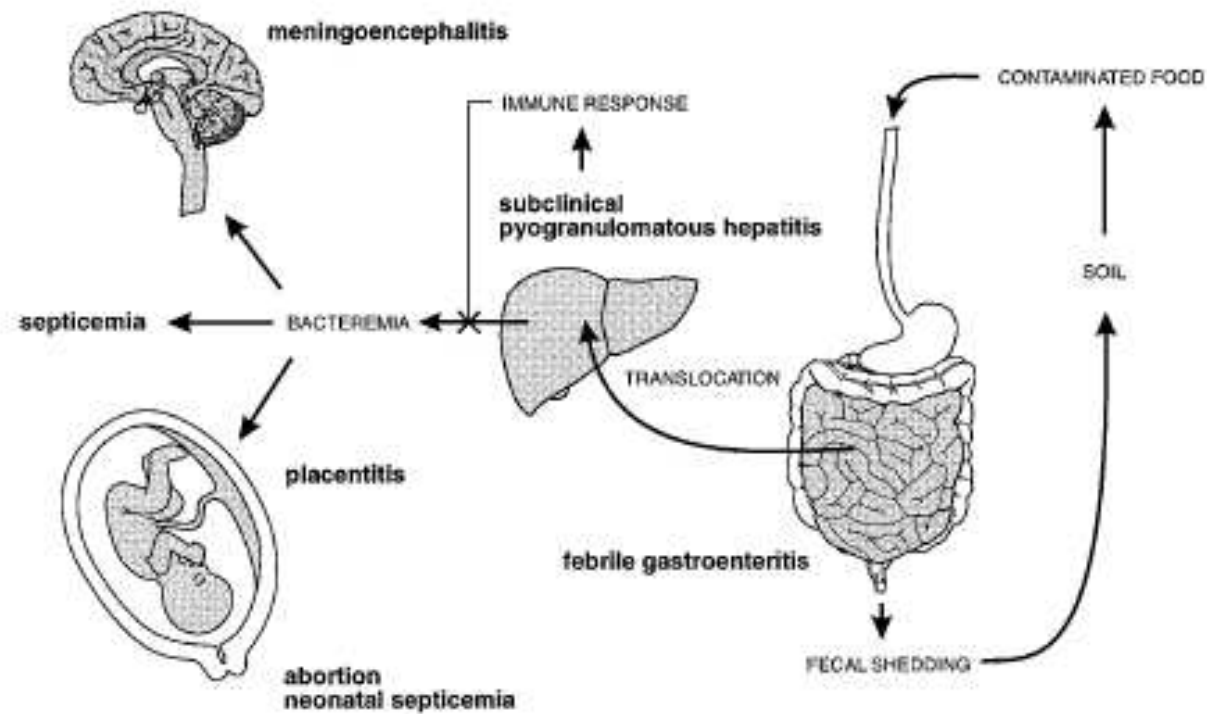


FIG. 2. Schematic representation of the pathophysiology of *Listeria* infection. See text for details.

Fattori che influenzano il decorso dell'infezione

- Dose infettante:
 - Non esiste una dose infettante minima
 - Tuttavia i dati di:
 - Numerazione della concentrazione negli alimenti causa di listeriosi
 - Dati di risk assessment
 - Dati da modelli animali
 - Evidenze epidemiologiche

Indicano che la dose infettante è generalmente alta ($>10^6$ ufc/g)

Fattori che influenzano il decorso dell'infezione

- Virulenza del ceppo
 - La maggior parte dei casi (50%) è sostenuto da ceppi del sierotipo 4b
 - All'interno del sierotipo 4b un ristretto gruppo di ceppi è responsabile dei focolai più gravi

Fattori che influenzano il decorso dell'infezione

- Stato immunitario dell'ospite
 - La maggior parte dei casi di Listeriosi negli adulti sono a carico di soggetti immunocompromessi (> 60 anni, malati cronici, trapiantati, AIDS, diabetici, lupus)
 - Le donne gravide presentano un fisiologico abbattimento delle difese immunitarie cellulo mediate

Fattori che influenzano il decorso dell'infezione

Soggetti Immunocompetenti

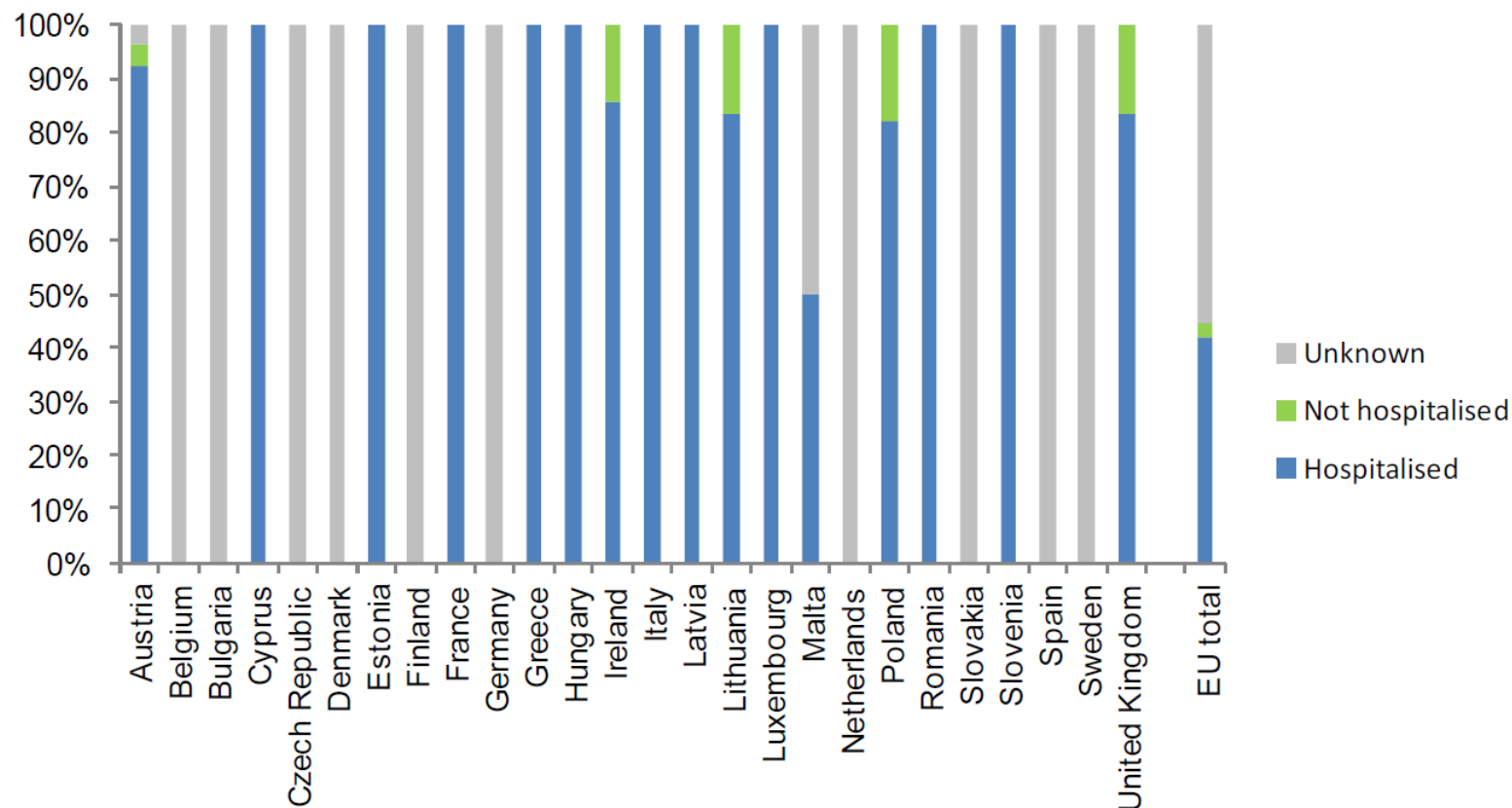
- Ingestione di $<10^5$ ufc
 - no malattia, risposta immunitaria cellulo mediata efficace, possibile piogranulomatosi subclinica
- Ingestione $> 10^6$ ufc
 - possibile forma gastroenterica entro 24 ore dal consumo

Country	2011			
	Report Type ¹	Cases	Confirmed Cases	Confirmed cases/100,000
Austria	C	26	26	0.31
Belgium	C	70	70	0.64
Bulgaria	A	4	4	0.05
Cyprus	C	2	2	0.25
Czech Republic	C	35	35	0.33
Denmark	C	49	49	0.88
Estonia	C	3	3	0.22
Finland	C	44	43	0.80
France	C	282	282	0.43
Germany	C	337	330	0.40
Greece	C	9	9	0.08
Hungary	C	11	11	0.11
Ireland	C	7	7	0.16
Italy	C	83	83	0.14
Latvia	C	7	7	0.31

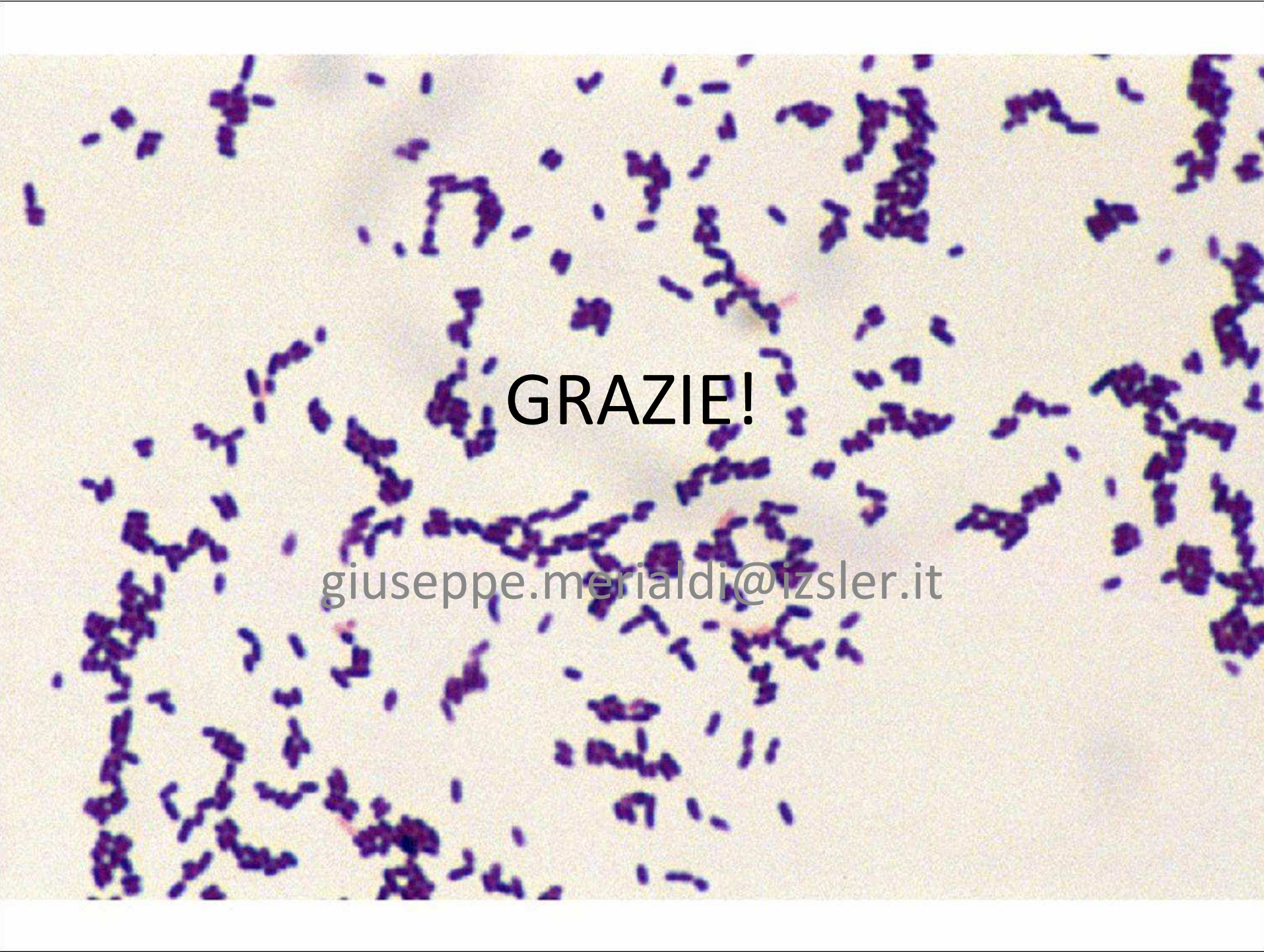
A total of 134 deaths due to listeriosis were reported by nineteen MSs in 2011. Twelve of these MSs reported one or more fatal case with France reporting the highest number, 46 cases. The EU case fatality rate was 12.7 % among the 1,054 confirmed cases for which this information was reported (71.4 % of all confirmed cases).

Poland	C	62	62	0.16
Portugal	- ²	-	-	-
Romania	C	9	9	0.04
Slovakia	C	31	31	0.57
Slovenia	C	5	5	0.24
Spain ³	C	91	91	0.79
Sweden	C	56	56	0.59
United Kingdom	C	164	164	0.26
EU Total		1,484	1,476	0.32

Figure LI2. Proportion of hospitalisation of reported confirmed cases of human listeriosis in the EU, 2011



Data on hospitalisation for listeriosis have been collected in the case-based reporting in TESSy for the last two years. Sixteen MSs provided this information for all or the majority of their cases, representing 43.7 % of all confirmed cases reported in the EU in 2011 (Figure LI2). On average, 93.6 % of the cases were hospitalised and, in 10 MSs, this proportion was 100 %. This is the highest hospitalisation of all zoonoses under EU surveillance and reflects the focus of surveillance on severe, systemic infections.

A microscopic image showing numerous purple-stained bacteria, likely Gram-negative, scattered across a light-colored background. The bacteria appear as small, dark, irregular shapes, some in chains and others as single cells. The staining is a deep purple or magenta color.

GRAZIE!

giuseppe.merialdi@izsler.it