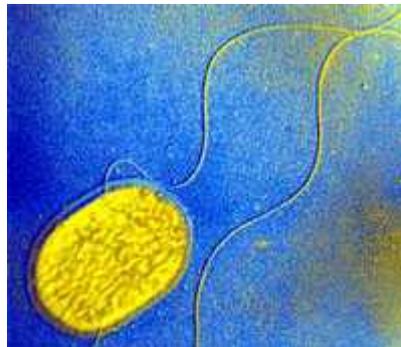


PROGETTO DI RICERCA FINALIZZATA DELLA REGIONE PIEMONTE:

**SPERIMENTAZIONE DI UN SISTEMA DI  
SORVEGLIANZA SULLE SALMONELLOSI NON  
EPIDEMICHE BASATO SULL'IMPIEGO DI TECNICHE  
DI TIPIZZAZIONE MOLECOLARE**



PRESENTATORE: INES CASONATO  
CO-PRESENTATORE: BARTOLOMEO GRIGLIO

Gruppo di lavoro:

Ines Casonato – Dirigente – Laboratorio dell'ospedale S. Croce di Moncalieri

Tiziana Civera – Professoressa Direttrice Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Grugliasco

Gianfranco Miotto – Direttore Laboratorio dell'ospedale S. Croce di Moncalieri

Bartolomeo Griglio – Direttore SC Igiene degli alimenti di origine animale - ASL 8 di Chieri

Roberta Goi - Igiene degli alimenti di origine animale - ASL 8 di Chieri

Giuseppe Sattanino - Igiene degli alimenti di origine animale - ASL 8 di Chieri

Sara Lomonaco – Biotecnologa - Borsista Facoltà di Medicina Veterinaria di Grugliasco

Valentina Marotta - Medico Veterinario - Borsista ARESS/CEIRSA

Lorenzo Pezzoli - Medico Veterinario - Borsista ARESS/CEIRSA

Ugo Tanti - Medico - referente delle MTA SIAN ASL 8

Anna Aldrighetti - assistente sanitaria - SIAN ASL 8

Paolo Castagno – assistente sanitario – SISP ASL 8

In collaborazione con la dottoressa Renata Magliola Referente MTA Regione Piemonte

## Indice:

❖ Introduzione		Pag. 4
❖ Obiettivi		Pag. 5
❖ Note metodologiche		Pag. 6
❖ Risultati e considerazioni	- Risultati di laboratorio - Risultati dell'indagine epidemiologica	Pag. 8
❖ Discussione e conclusioni		Pag. 16
❖ Allegato:	- Il questionario	Pag. 20
❖ Bibliografia		Pag. 22

## INTRODUZIONE

Dalla metà degli anni '80 il numero di casi di salmonellosi umana è cresciuto nella maggior parte dei paesi industrializzati confermandosi, in Italia, la principale causa di malattia alimentare. Si tratta di tossinfezioni alimentari che oltre a manifestarsi con particolare gravità nelle categorie più sensibili della popolazione hanno un impatto sociale notevole per il gran numero di soggetti coinvolti ed il rilievo dato dai mass-media.

L'attuale sistema di sorveglianza piemontese prevede che le indagini epidemiologiche finalizzate ad individuare la causa della malattia alimentare, siano adottate a seguito della segnalazione, da parte delle strutture sanitarie di riferimento, di sintomatologia riferibile ad intossicazione o tossinfezione alimentare in 2 o più cittadini. Sfuggono pertanto tutti i casi asintomatici o paucisintomatici soprattutto se si manifestano senza una diretta correlazione geografica o temporale. Le linee emanate nel 2002 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità sulla sicurezza alimentare (WHO Global Strategy on Food Safety) evidenziano la necessità di incrementare le potenzialità di investigazione sulle malattie a trasmissione alimentare sia per la pianificazione delle strategie di prevenzione sia per valutare l'efficacia delle attività di controllo sulle filiere alimentari.

In quest'ottica a partire dal 1996 è stata messa a punto negli Stati Uniti ed è in fase di rapida diffusione in tutti i Paesi europei una nuova metodica di indagine denominata *PulseNet* in grado di coniugare i progressi tecnico-scientifici della biologia molecolare e dell'informatica con l'epidemiologia di campo.

Si tratta di un network database sul quale, dai laboratori analisi collegati, vengono fatti confluire e confrontati tra loro i profili ottenuti mediante elettroforesi in campo pulsato su gel (PFGE) di microrganismi isolati dall'uomo e dalle matrici alimentari. L'individuazione di cluster comuni consente di avviare indagini con particolare tempestività in fasi pre-epidemiche aumentando le possibilità di individuare correlazioni eziologiche tra alimento e malattia nell'uomo.

Con l'ausilio di un fondo per la ricerca sanitaria finalizzata della Regione Piemonte, nell'ASL 8, in collaborazione con l'ospedale S. Croce di Moncalieri ed il supporto laboratoristico dell'Università di Medicina Veterinaria di Torino, è stato proposto un progetto di sorveglianza sperimentale sui casi di salmonellosi isolati sul territorio ed identificati come "sporadici", mediante impiego della PFGE, e contemporanea indagine epidemiologica e diagnostica sugli eventuali alimenti coinvolti.

La scelta dell'ASL 8 tra le ASL del territorio piemontese è legata ai risultati del recente rapporto "*Progetto di sorveglianza sanitaria delle malattie trasmesse da alimenti*", della Regione Piemonte. Il progetto, che riporta gli isolamenti e le tipizzazioni effettuate dai laboratori

analisi degli ospedali piemontesi (tra cui i presidi di Chieri, Moncalieri e Carmagnola,) evidenzia un'elevata prevalenza di questo microrganismo, ed in particolare del sierotipo *Salmonella* Typhimurium in tale contesto territoriale. L'aggregazione dei dati disponibili, evidenzia l'isolamento e l'invio alla tipizzazione di questo germe nella ASL 8 in 30,6 abitanti ogni 100.000 dato di quasi 3 volte superiore all' 11,4 ogni 100.000 abitanti della media regionale seppur ancora inferiore ai 51 isolamenti ogni 100.000 abitanti della media Europea. Emerge inoltre una differente distribuzione geografica dei sierotipi considerati potenzialmente più patogeni: nei presidi di Chieri e Carmagnola (bacino di utenza misto rurale e cittadino) si evidenzia una prevalenza di *Salmonella* Typhimurium (S.T.) mentre *Salmonella* Enteritidis (S.E.) prevale a Moncalieri (bacino di utenza cittadino).

Il progetto, partendo dalla raccolta dei profili PFGE di ceppi di *Salmonella* isolati in pazienti positivi, si propone di sperimentare un protocollo di indagine epidemiologica su casi singoli, attualmente esclusi dalle linee guida sulla sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare della Regione Piemonte, che risultino appartenenti a cluster comuni.

## **OBIETTIVI**

Gli obiettivi operativi del gruppo di lavoro multidisciplinare (Dipartimento di Prevenzione ASL8 di Chieri, sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del dipartimento di Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria e laboratorio di patologia clinica dell'ospedale S. Croce di Moncalieri) che si è costituito sono i seguenti:

- Sviluppo e validazione di una tecnica rapida di caratterizzazione biomolecolare di *Salmonella* mediante PFGE presso il settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale (Università degli Studi di Torino);
- tipizzazione molecolare di tutti i ceppi di *Salmonella* isolate dall'uomo presso il laboratorio di patologia clinica dell'ospedale di Moncalieri;
- monitoraggio mirato alla ricerca di *Salmonella* in alimenti reperibili presso le abitazioni dei soggetti colpiti ed eventuale estensione dell'indagine all'ambiente;
- creazione di un database sperimentale a livello locale per la definizione di profili prevalenti ed eventualmente correlati;
- adozione di tecniche di indagine epidemiologiche per l'identificazione dell'origine di cluster isolati dall'uomo.

Tale progetto potrebbe avere sul Sistema Sanitario Regionale una significativa ricaduta. Sarebbe possibile, infatti, adottare il sistema sperimentato a livello regionale standardizzando le tecniche analitiche e realizzando un network, basato sulla partecipazione del laboratorio di Novara, riferimento per la sorveglianza sulla salmonella nell'uomo, i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico e dell'ARPA che effettuano le ricerche e gli isolamenti sulle matrici alimentari, i

laboratori del settore Ispezione degli alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino che consenta l'immediato correlazione tra gli isolamenti effettuati nell'uomo e quelli negli alimenti.

## NOTE METODOLOGICHE

Il lavoro realizzato si distingue in una parte analitica, svolta presso il laboratorio dell'Ospedale S. Croce di Moncalieri e del settore di Ispezione degli Alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria di Grugliasco e una parte epidemiologica eseguita presso il Dipartimento di Prevenzione - Servizio Veterinario Area B: "Igiene degli alimenti di origine animale" con la collaborazione del referente delle Malattie Trasmesse da Alimenti del Servizio di Igiene Alimenti e Nutrizione ed il referente del Sistema Informatizzato delle Malattie Infettive.

Nel periodo compreso tra Marzo 2005 e Maggio 2006, presso l'ospedale di Moncalieri, sono stati isolati 100 ceppi di *Salmonella* da pazienti con sintomatologia clinica. Presso lo stesso laboratorio sono state preparate le sub-culture su terreno agarizzato a becco di clarino di ogni ceppo di *Salmonella* isolato per l'invio al laboratorio di riferimento di Novara. I campioni sono stati identificati con apposita numerazione interna al laboratorio al fine di consentirne la tracciabilità ed il confronto con i risultati pervenuti dal laboratorio di Novara.

Contemporaneamente i campioni sono stati trasmessi al laboratorio del settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Grugliasco per conferma ed identificazione tramite protocolli PCR descritti in letteratura e la determinazione del pulsotipo.

L'identificazione di *Salmonella* spp. e *Salmonella* Typhimurium è stata effettuata utilizzando contemporaneamente primers in grado di amplificare un frammento del gene invA (Rahn et al., 1992) e frammenti dei geni codificanti per l'antigene somatico "O" e gli antigeni flagellari "H"- rfbj, fliC, FliB (Lim et al., 2003). I ceppi identificati come ST sono stati altresì sottoposti a PCR per l'individuazione del fagotipo DT104 (Khan et al., 2000).

I ceppi identificati come *Salmonella* spp. sono stati testati con primers specifici per *Salmonella* Enteritidis (Soumet et al., 1999).

I profili di macroestrazione, sono stati generati tramite PFGE utilizzando il protocollo rapido (1). Per la standardizzazione della PFGE si è utilizzato come riferimento un ceppo di *Salmonella* Braenderup, gentilmente fornito dall'IZS. Le plugs, il ceppo di riferimento ed il marker molecolare  $\lambda$  DNA sono stati separati tramite PFGE e colorati con bromuro d'etidio per la visualizzazione. Le immagini dei profili ottenuti sono state analizzate con il software BioNumerics (Applied Maths) e normalizzate in base alle corse di almeno 3-5 ceppi di riferimento per gel.

I valori di similarità sono stati calcolati tramite il metodo Complete Linkage e coefficiente Dice dal software Bionumerics (1,5% position tolerance).

I risultati ottenuti sono stati confrontati e trasmessi alla struttura di Igiene degli alimenti Servizio Veterinario Area B per lo svolgimento dell'indagine epidemiologica.

Sui ceppi con identico pulsotipo si è proceduto ad identificare i soggetti ed i relativi recapiti telefonici per l'effettuazione delle interviste.

L'attuazione dell'indagine è stata svolta mediante questionario proposto per via telefonica, precedentemente elaborato e formulato, al fine di individuare alimenti correlabili all'episodio tossinfettivo sui quali, eventualmente, prelevare campioni per la ricerca del microrganismo patogeno. Per i pazienti di giovane età l'intervista è stata rivolta ad uno dei genitori.

Per l'analisi dei dati il Servizio Veterinario di Area B si è avvalso del programma EPI INFO, attraverso il quale è stato creato un database utile per la realizzazione dell'analisi dei dati.

Il **calcolo delle frequenze** ha permesso di ottenere dati numerici ed informazioni descrittive sui casi esaminati.

## **II QUESTIONARIO**

Il questionario è stato realizzato con riferimento al modello previsto dal Centro di Riferimento Regionale per la Sorveglianza, la Prevenzione ed il Controllo delle Malattie Trasmesse da Alimenti, per episodi epidemici (2 o più casi correlati tra loro dal punto di vista temporale e geografico) modificato sulla base del questionario disponibile sul sito della CDC per indagini analoghe.

È stato strutturato in 5 diverse sezioni contenenti domande aperte, dicotomiche, ed a crocette così suddivise:

- una prima parte contenente i dati personali relativi ai soggetti interessati: nome, cognome, età, sesso, luogo di residenza;
- una seconda sezione contenenti indicazioni relative al tipo di sintomatologia manifestata ed al decorso clinico;
- una terza parte relativa al luogo abituale di consumo dei pasti, agli alimenti consumati nelle 48/72h precedenti o nel periodo precedente alla comparsa dei sintomi e alle persone eventualmente coinvolte nell'episodio tossinfettivo;
- una quarta parte relativa al contatto con animali domestici (cani, gatti, animali esotici, volatili) e l'accesso a giardini, considerati, insieme agli alimenti ingeriti, altri probabili fattori di rischio nel contagio della malattia;
- l'ultima sezione è stata dedicata alla frequentazione di luoghi comuni quali circoli, scuole, comunità, impianti sportivi, etc.

L'intervista è stata preceduta da informazioni introduttive, fornite dai collaboratori che hanno effettuato le telefonate, in merito agli obiettivi ed alle finalità dell'intervista. Sono stati intervistati solamente i pazienti da cui sono state isolate salmonella appartenenti allo stesso ceppo con identico profilo.

Mediante il programma informatico *Epi Info* è stato realizzato un database di informazioni per successive aggregazioni ed analisi statistiche.

## **RISULTATI E CONSIDERAZIONI**

### ***Risultati di laboratorio***

Nel periodo compreso tra Marzo 2005 e Maggio 2006 sono stati registrati 100 episodi di Salmonellosi apparentemente non correlate tra loro.

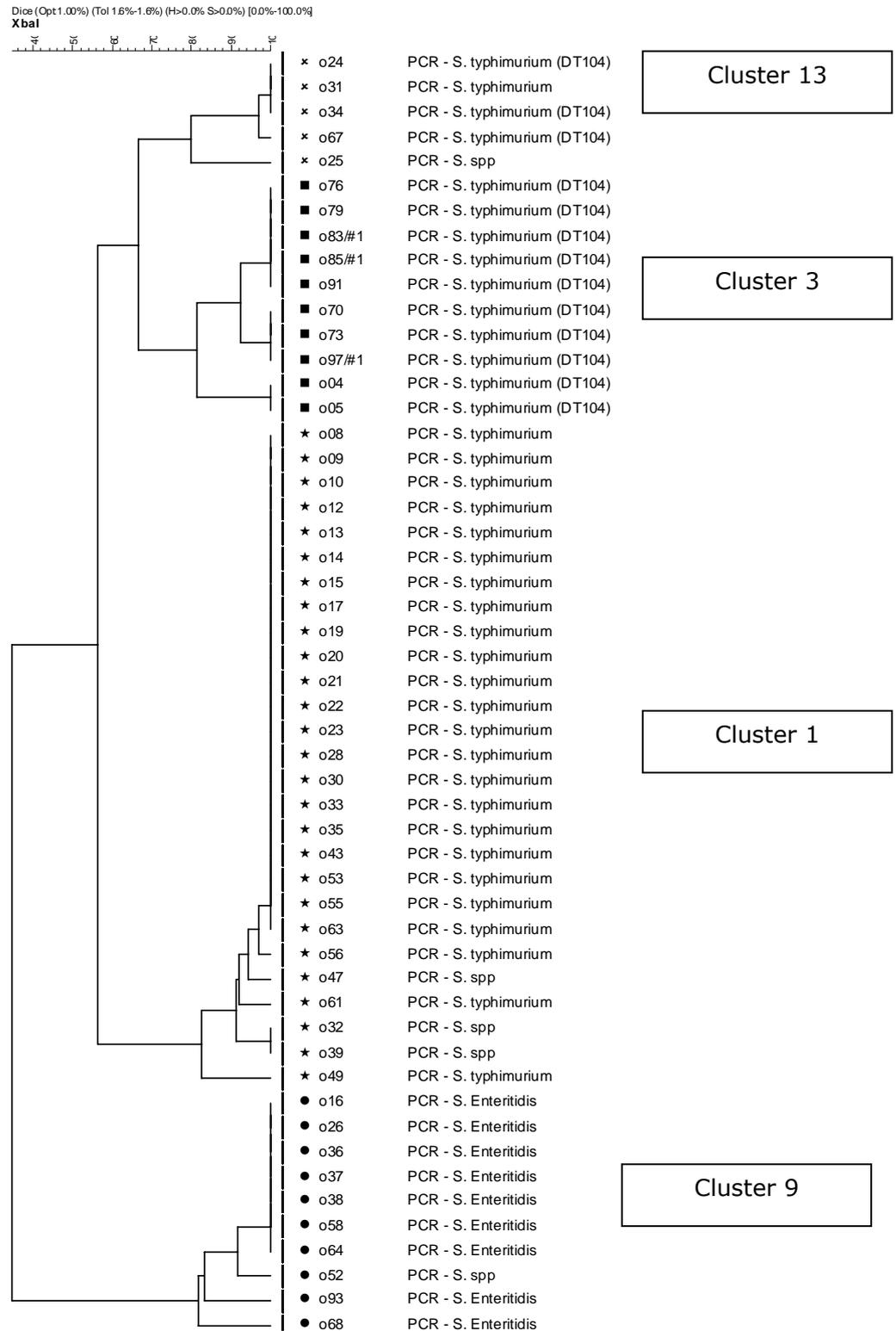
In tutti i ceppi isolati si è amplificato il frammento inVA confermando l'appartenenza al genere *Salmonella*. Di questi, 56 hanno mostrato con la multiplex PCR un profilo riconducibile a *Salmonella* Typhimurium e 13 sono risultate DT104. *Salmonella* Enteritidis è stata identificata nel 10% dei casi (10 su 100).

L'analisi dei pattern ottenuti con la PFGE ha raggruppato gli isolati in 15 cluster. Scegliendo come valore minimo di similarità l'80%, sono stati osservati 4 cluster principali (figura 1).

Nel cluster 1 (N=29) sono state identificate 24 S.T. e tra queste 21 presentavano un identico profilo PFGE, indicando un possibile focolaio. I ceppi sono stati isolati nel periodo compreso fra il 30/5 e il 16/10, ed è stato possibile tracciare una prima curva epidemica a giugno con il culmine nella seconda decina del mese (9 isolati) e un successivo decremento (5 casi a luglio e agosto ed altri 7 casi tra settembre ed ottobre). Il cluster 3 (N=10), comprende solo *Salmonelle* Typhimurium. Queste sono state inoltre testate per l'individuazione del fagotipo multiresistente DT 104. In questo cluster ricadono 10 ceppi identificati DT104. Le rimanenti DT104 ricadono nel cluster 13 (N=5), composto da S.T. (n=4) e *Salmonella* spp. (n=1). Il valore di similarità per questo cluster è dell'80%, ma le DT104 presentano una similitudine del 92%, indicando una clonalità degli isolati DT104. Un ceppo S.T., con pattern PFGE indistinguibile da altre DT104, non presenta amplificazione del gene portatore della resistenza al florfenicolo; questo risultato non esclude tuttavia l'appartenenza al fagotipo DT104, essendosi tale evenienza già verificata in ceppi isolati nella filiera suinicola, e si rende pertanto necessaria la conferma mediante fagotipizzazione.

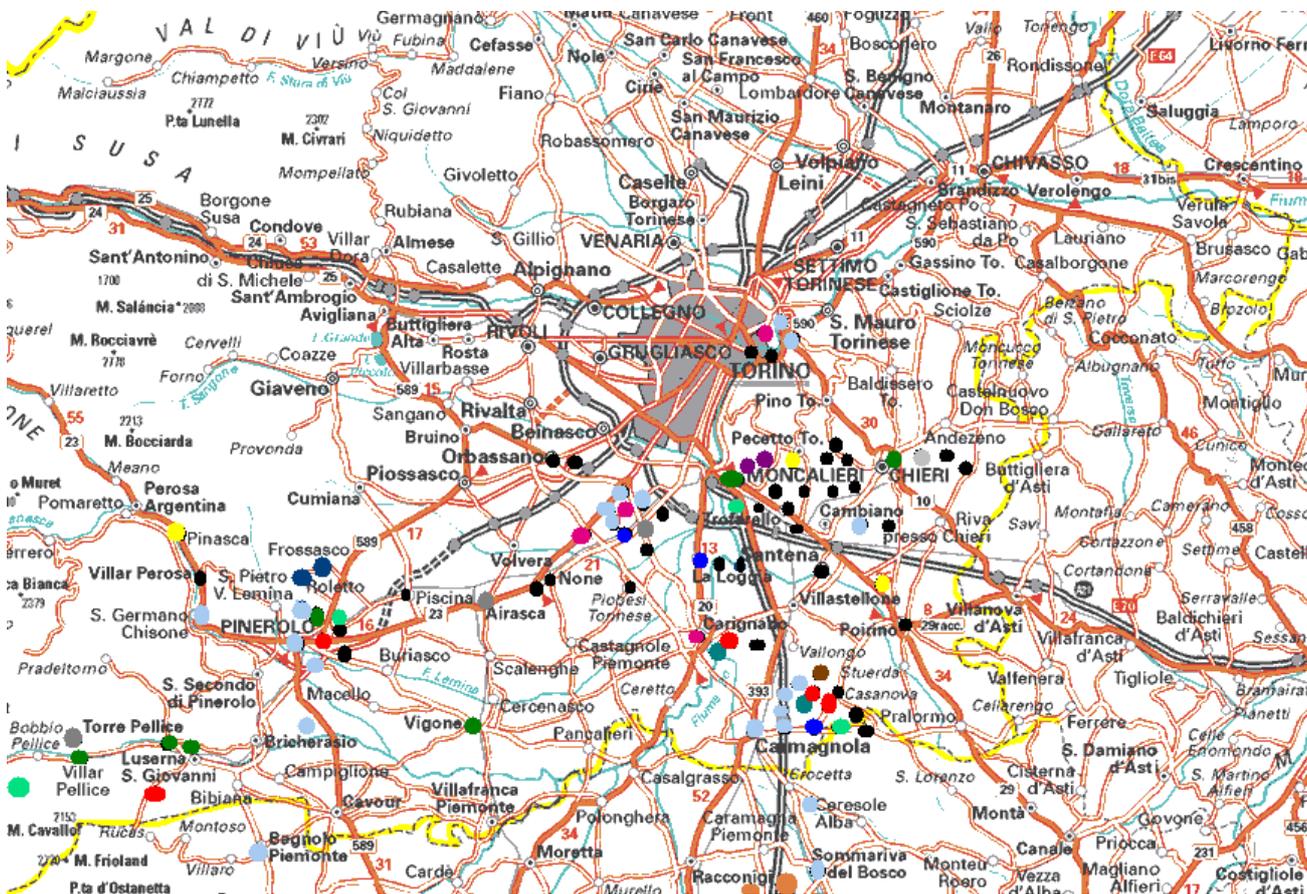
Il cluster 9 (10 ceppi), comprende 7 ceppi caratterizzati da identico profilo 3 dei quali isolati da un unico nucleo familiare. In questo cluster ricadono 9 dei 10 ceppi di S.E. identificati tramite PCR.

**Grafico 1 – Rappresentazione grafica dei cluster n°1,3,9 e 13.**



## Risultati dell'indagine epidemiologica

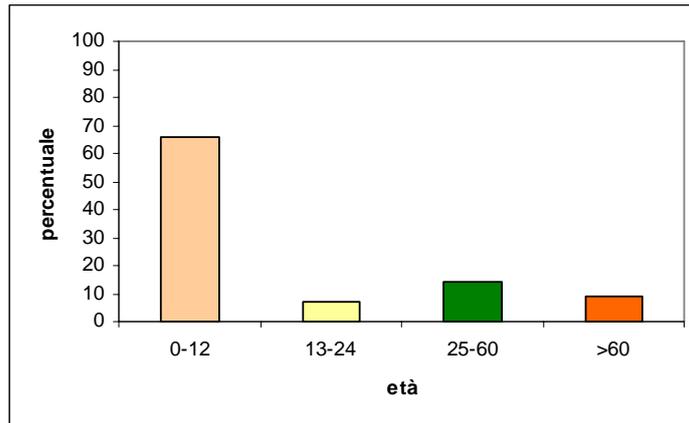
La cartina mostra la distribuzione spaziale di tutti i casi isolati.



\* I puntini colorati mostrano i casi con profilo identico. I casi identificati con i puntini neri non presentano invece similarità.

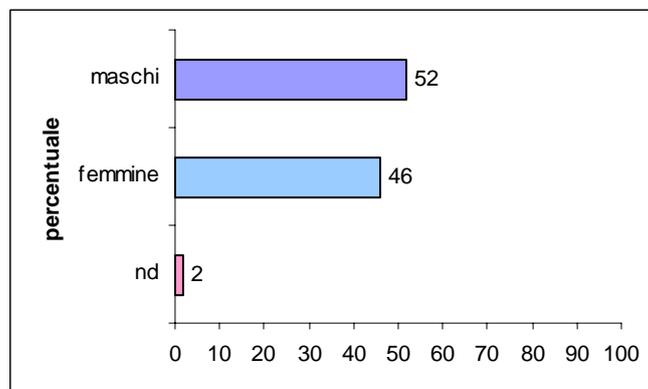
I dati raccolti tramite l'indagine epidemiologica si riferiscono ad un totale di 37 pazienti intervistati.

I dati anamnestici generali mostrano come la maggior parte dei **soggetti colpiti** siano **bambini** con età compresa tra 0 e 12 anni (66%); nei soggetti con un sistema immunitario competente la percentuale mostra un andamento decrescente registrando percentuali del 7% negli individui con età compresa tra i 13 e 24 anni e del 14% nei soggetti di età compresa tra 25-60 anni. Bassa risulta la percentuale dei soggetti sopra i 60 anni colpiti (9%) (grafico n.2). In 4 casi non è stata resa nota l'età dei soggetti.



**grafico n.2 – distribuzione per età dei casi isolati**

Non si è riscontrata una prevalenza di sesso tra i soggetti analizzati.



**grafico n.3 – distribuzione per sesso dei casi isolati**

Il maggior numero di intervistati (65%) dichiara di essersi recato all'ospedale (ospedalizzazione, day-hospital, dea) in seguito alla preoccupante sintomatologia .

Il decorso clinico è stato variabile: il 35,2% dei soggetti è stato ospedalizzato in seguito alla comparsa di una grave sintomatologia, il 18,9% è stato ricoverato in day-hospital, il 10,8% si è recato in pronto soccorso, mentre il 24,3% degli intervistati è rimasto in casa (*grafico n.4*).

Per dare maggiore visibilità, considerando che valori percentuali superano di poco il 30%, si è ritenuto opportuno inserire sull'asse delle ordinate solamente valori fino al 50%.

Il dato "n. di giorni di ospedalizzazione" è stato omesso dalla maggioranza degli intervistati ricoverati (*grafico n.5*) .

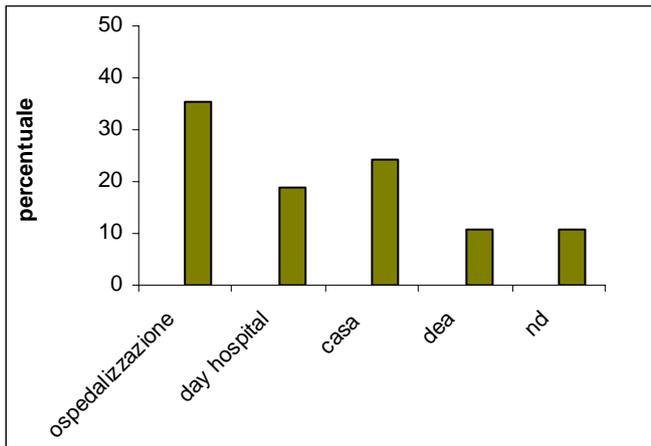


grafico n.4 – decorso clinico dei pazienti intervistati

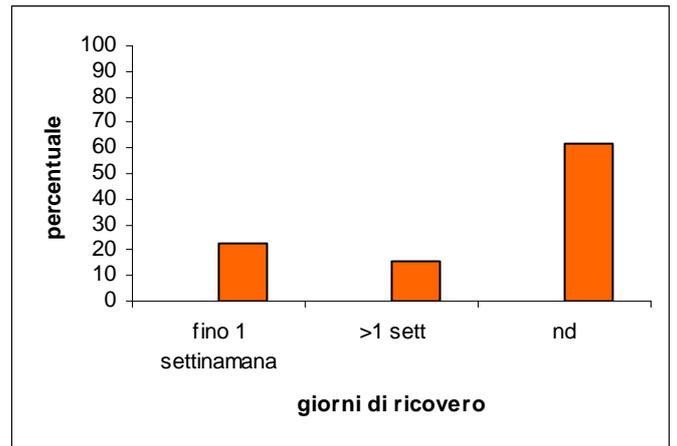


grafico n.5 – Pazienti ospedalizzati: giorni di ricovero

La durata della sintomatologia è stata di circa una settimana per il 51,4% degli intervistati e solo del 16,2% per tempo superiore. Anche in questo caso alcuni pazienti non hanno risposto alla domanda (32,4%).

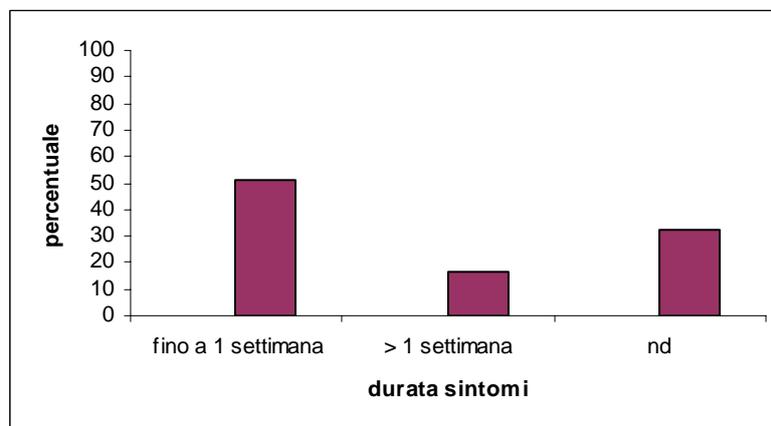
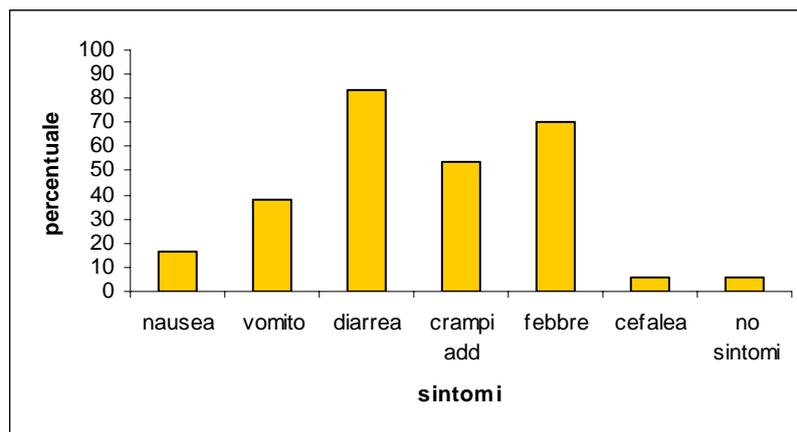


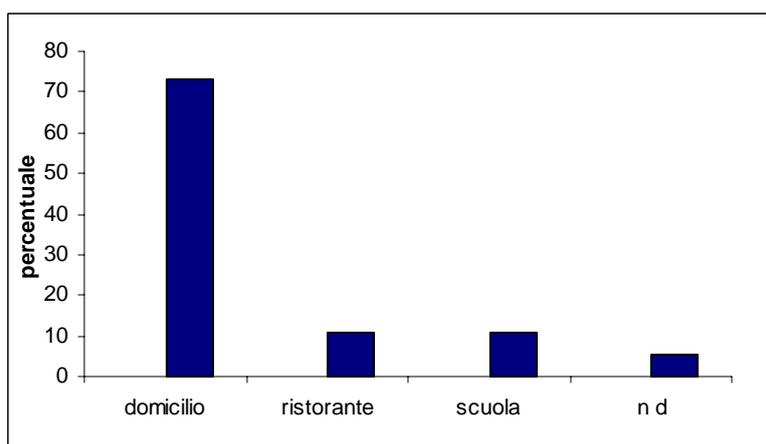
grafico n.6 – Durata dei sintomi riferita dai soggetti intervistati

La diarrea (83,8%) e la febbre (70,3) sono i sintomi che si sono verificati in maggiore percentuale, seguono crampi addominali (54%), vomito (37,8%), nausea (16,2%) e cefalea (5,4%)(grafico n.6).



*grafico n.6 – Sintomatologia riferita dai soggetti intervistati*

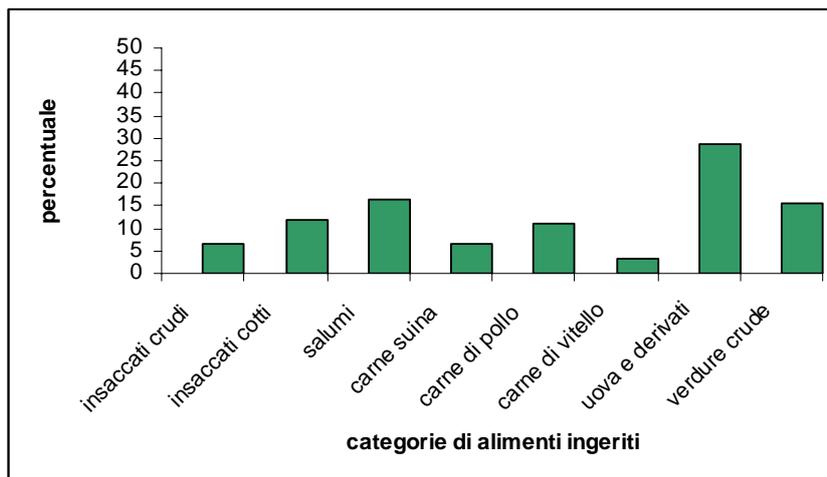
**Il consumo dei pasti** è avvenuto nella quasi totalità dei casi all'interno del proprio **domicilio** (73%).



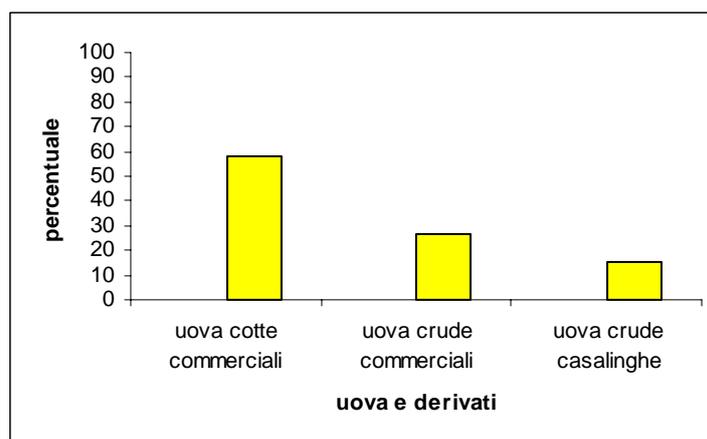
*grafico n.7 – luogo di consumo dei pasti dei soggetti intervistati*

La maggioranza dei soggetti intervistati non è stata in grado di indicare in modo preciso i cibi consumati nelle 48/72 ore precedenti la comparsa della sintomatologia.

Per quanto riguarda gli alimenti consumati nel periodo precedente la comparsa dei sintomi, tutti i soggetti hanno riferito il consumo di più categorie di cibi considerati a rischio (*grafico n.8-9*). Tra le diverse tipologie le uova ed i suoi derivati (maionese, creme, tiramisù etc..) sono la categoria maggiormente rappresentata (26,97%) seguita dai salumi (16,85%) e dalle verdure crude (15,74%). Per dare maggiore visibilità, considerando che i valori percentuali non raggiungono il 30%, si è ritenuto opportuno inserire sull'asse delle ordinate solamente valori fino al 50%.

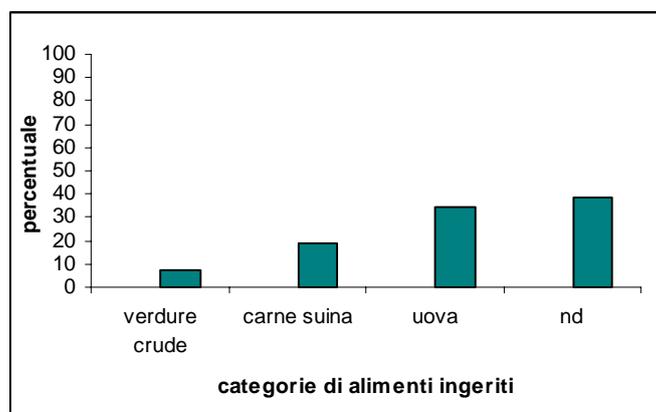


*grafico n.8 tipologie di alimenti consumati nel periodo precedente la comparsa dei sintomi*

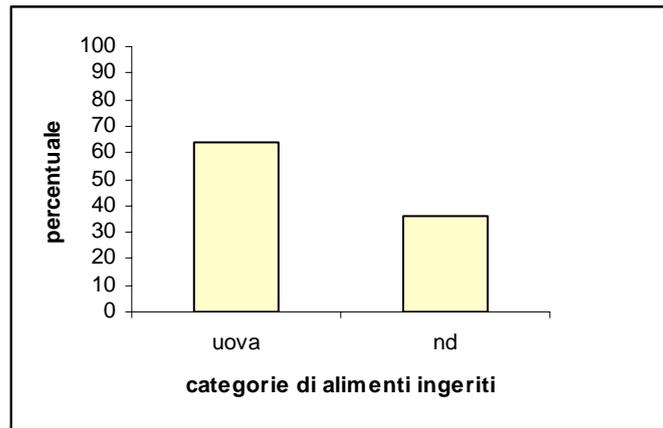


*grafico n.9 Tipologie di uova consumate nel periodo precedente la comparsa dei sintomi*

Salmonella typhimurium e Salmonella spp: alimenti a confronto (grafico n. 10, n.11)



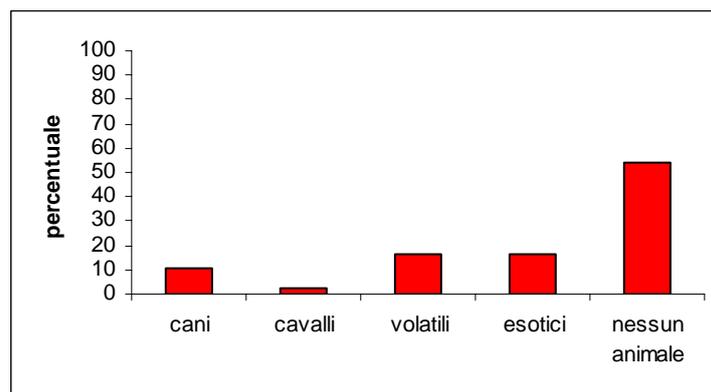
*Grafico n.10 – Salmonella typhimurium: categorie di alimenti ingeriti dai pazienti nelle 48/72 h precedenti alla comparsa dei sintomi*



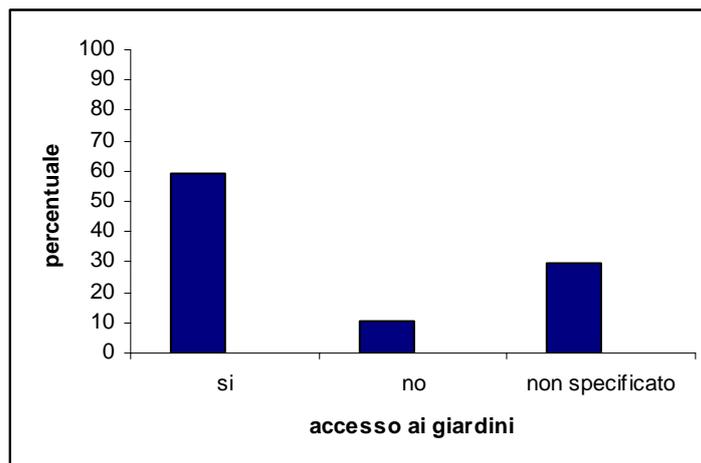
**Grafico n.11 – Salmonella spp.:**  
**alimenti ingeriti dai pazienti nelle 48/72 h precedenti alla comparsa dei sintomi**

Dai grafici (grafico n.10-n.11) emerge che le uova sono considerate responsabili sia delle infezioni da *Salmonella typhimurium* sia delle infezioni da *Salmonella* spp.: va tuttavia tenuto presente che spesso i pazienti possono essere stati influenzati del personale ospedaliero nell'identificazione dell'alimento veicolo dell'infezione.

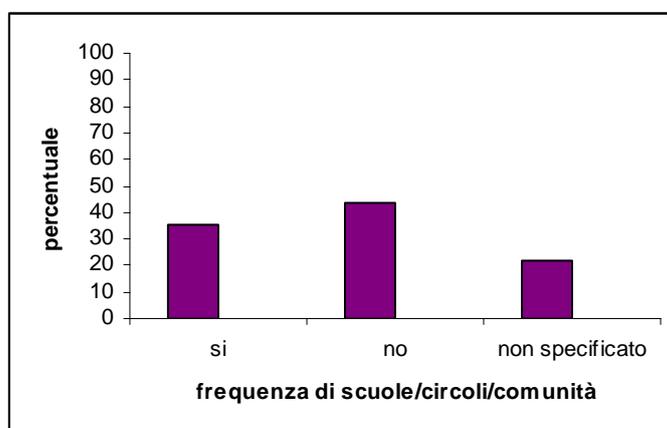
Solo il 16,22% dei soggetti intervistati ha avuto contatti con volatili ed animali esotici, possibili vettori di contagio della malattia (grafico n. 12) mentre più della metà dei soggetti (54,05%), non possiede animali. Per quanto riguarda i fattori ambientali comuni, il 59,46 % dichiara di frequentare giardini e spazi aperti ed il 35,14% di frequentare scuole, circoli o comunità (grafico n.13).



**grafico n.12 – Animali venuti a contatto con i pazienti intervistati**



*grafico n. 13 – Altri possibili fattori di rischio nella trasmissione della salmonellosi*



*grafico n. 13 – Altri possibili fattori di rischio nella trasmissione della salmonellosi*

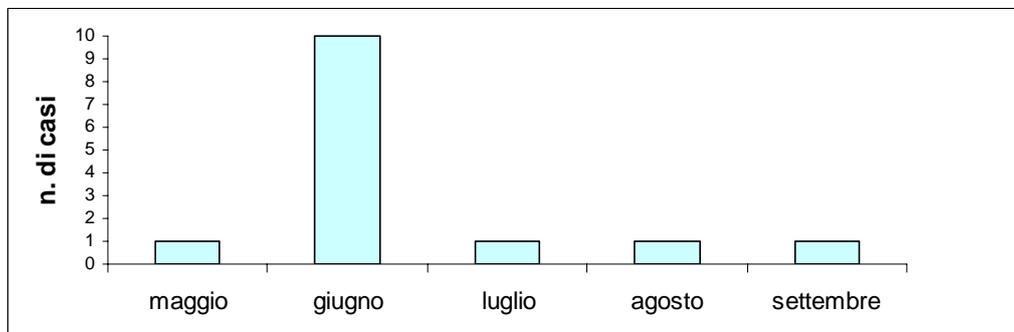
### **Confronto con i ceppi di *Salmonella* spp. Isolati durante i programmi di controllo sugli alimenti.**

Presso il Laboratorio dell'Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine animale sono state effettuate tra il 2004 ed il 2005, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, della Liguria e della Valle d'Aosta, indagini per valutare prevalenza e sierotipi di salmonella su carni suine e uova. I ceppi di *Salmonella* spp. isolati durante tali campionamenti sono stati analizzati con la PFGE ed inseriti nel database.

Dal confronto dei genotipi sono emerse in 2 casi correlazioni tra le salmonella isolate in pazienti e quelle isolate da alimenti.

Di particolare rilievo è risultata invece essere la correlazione evidenziata dal network database, in cui sono confluiti dati provenienti da controlli su matrici alimentari, tra una salmonella isolata da un campione di salsiccia prelevata in un salumificio della provincia di Asti e gli isolamenti umani del cluster 1 (24 Salmonelle Typhimurium di cui 21 con un identico profilo PFGE).

È pertanto molto probabile che l'epidemia di salmonellosi che ha colpito 21 pazienti dei 100 controllati nel periodo dal 30/05/2005 al 16/10/2005 sia legata alla circolazione di carni suine (carne fresca, salsiccia ma più probabilmente insaccati freschi consumati tal quale) contaminate.



**Grafico 14-cluster 1 casi di salmonellosi:** sono stati inclusi nel grafico solamente i casi che hanno fornito indicazioni sull'inizio dell'insorgenza dei sintomi



In un secondo caso, da un paziente che ha manifestato sintomi nella metà del mese di ottobre 2005 è stato isolato un batterio identificato come *Salmonella Enteritidis* identica a quella ritrovata in un campione ufficiale di uova commercializzate presso una catena di supermercati della zona. Il consumo di tiramisù fatto in casa è pertanto in questo caso la probabile causa della infezione.

### Discussione e conclusioni

Solamente in un caso è stato possibile disporre di informazioni per il campionamento mirato di alimenti potenzialmente contaminati. Il campione di uova acquistati in un allevamento familiare di una cascina usato per la produzione di maionese casalinga è stato prelevato ed analizzato, ma il riscontro dell'analisi è risultato negativo.

Non è stato possibile inoltre identificare, sulla base delle interviste, un alimento comune consumato dai pazienti da cui sono state isolate salmonella con profili identici.

Le difficoltà di coordinamento, legate anche al periodo estivo di vacanza in cui si sono registrati il maggior numero di casi correlati, hanno influenzato in modo negativo l'indagine epidemiologica.

Altre difficoltà si sono riscontrate nell'effettuazione delle interviste, per la diffidenza dell'intervistato nel fornire informazioni inerenti la propria sfera privata (abitudini alimentari, luogo di consumo dei pasti).

Si è inoltre osservato che il personale sanitario, al momento della redazione della cartella clinica, ha indirizzato l'attenzione del paziente su alcune categorie di alimenti, in particolare le uova, condizionando la successiva raccolta delle informazioni.

La ricerca ha confermato l'estrema utilità della PFGE nell'evidenziare legami tra episodi tossinfettivi apparentemente non correlati. L'efficacia di questo sistema di sorveglianza è tuttavia subordinata a un rapido e pronto collegamento fra le parti interessate (laboratori di analisi-unità responsabile delle indagini epidemiologiche) e alla predisposizione di protocolli di intervento da utilizzarsi anche in caso di tossinfezioni apparentemente isolati.

La tipizzazione delle salmonelle ha inoltre consentito di evidenziare la circolazione, con una elevata prevalenza, nella popolazione esaminata, di ceppi particolarmente patogeni in relazione alla possibile antibiotico resistenza (*Typhimurium* DT 104). Al di là delle convinzioni diffuse in gran parte del personale sanitario che tende ad attribuire esclusivamente all'uovo ed ai prodotti alimentari da esso derivati il ruolo di diffusione della salmonella, numerosi studi identificano il suino quale possibile fonte di alcuni ceppi quali le *Typhimurium*.

Confronto tra Salmonelle isolate nell'uomo e nel suino			
<b>Belgio Casi 12.008-anno 1996 *</b>	<b>Belgio 1997 (carni suine)*</b>	<b>Center of Disease Control USA 1994 (sierotipi isolati in ordine decrescente)**</b>	<b>USA '95-96 (indagini in allevamento) (sierotipi isolati in ordine decrescente)**</b>
<i>Enteritidis</i> 51,2%	<i>Typhimurium</i> 26,4%	<i>Enteritidis</i>	<i>Derby</i>
<i>Typhimurium</i> 29,3%	<i>Derby</i> 17%	<i>Typhimurium</i>	<i>Agona</i>
<i>Hadar</i> 5%	<i>Brandenburg</i> 15,1%	<i>Heidelberg</i>	<i>Typhimurium copen.</i>
<i>Infantis</i> 2,2%	<i>Bovimorbificans</i> 12,5%	<i>Newport</i>	<i>Brandenburg</i>
<i>Brandenburg</i> 1,8%	<i>Infantis</i> 9,7%	<i>Hadar</i>	<i>Mbandaka</i>
<i>Virchow</i> 1,5%	<i>Enteritidis</i> 1,9%	<i>Agona</i>	<i>Typhimurium</i>
<i>Bovimorbificans</i> 1,1%	<i>Altre</i> 31,4%	<i>Montevideo</i>	<i>Heidelberg</i>
<i>Derby</i> 1%		<i>Oranienburg</i>	<i>Anatum</i>
<i>Altre</i> 6,9%		<i>Thompson</i>	<i>Enteritidis</i>
		<i>Muenchen</i>	<i>Worthington</i>

\* Proceedings 4<sup>th</sup> World Congress Foodborne Infections and Intoxications

\*\* Centers for Epidemiology and Animal Health: "Shedding of Salmonella by finisher hogs in U.S."

Nei Paesi europei a suinicoltura avanzata, sono state impostate campagne di controllo o eradicazione proprio per le salmonella dotate di multiresistenza agli antibiotici, partendo dagli allevamenti suini, mediante l'implementazione di screening, eliminazione dei portatori e implementazione di misure di biosicurezza, individuando metodiche di monitoraggio e controllo nelle fasi di macellazione, trasformazione, commercializzazione, sino ad arrivare all'informazione del cittadino.

Sulla base delle esperienze acquisite presso l'ASL 8, il progetto concluso potrebbe avere uno sviluppo basato su un approfondimento dell'indagine epidemiologica con la progettazione di uno studio caso-controllo al fine di poter individuare, seppur su un numero limitato di casi, con un livello di significatività statistica accettabile, quali siano effettivamente gli alimenti che con maggiore probabilità sono implicati nella trasmissione delle salmonelle più pericolose (*Typhimurium*, *Enteritidis*) alla popolazione.

**ALLEGATO N.1**

**QUESTIONARIO INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SALMONELLA**

**DATI GENERALI**

COGNOME

NOME

INDIRIZZO

COMUNE

CAP

SESSO

DATA DI NASCITA  
(ETA')

**DECORSO**

OSPEDALIZZAZIONE

DAY-HOSPITAL

CASA

DEA (pronto soccorso)

**SINTOMATOLOGIA**

FEBBRE  TEMPERATURA  NAUSEA  VOMITO

DIARREA  CEFALEA  CRAMPI  
ADDOMINALI

**ANAMNESI**

DATA CAMPIONE

DATA INSORGENZA  
SINTOMI

DURATA DEI  
SINTOMI

ALIMENTI INGERITI  
NELLE  
48/72hPRECEDENTI

ALTRI FAMILIARI CON SINTOMATOLOGIA CLINICA O POSITIVI ALL'ESAME COPROLOGICO

PERSONE CHE HANNO INGERITO IL POSSIBILE ALIMENTO CONTAMINATO SANE

**LUOGO DI CONSUMO DEI PASTI NELLE 24/72H PRECEDENTI ALLA COMPARSA DEI  
SINTOMI**

DOMICILIO

RISTORANTI

SCUOLA

MENSA AZIENDALE

**ALIMENTI CONSUMATI**

INSACCATI CRUDI (salsicce)  LUOGO DI ACQUISTO MARCA  
 PRODOTTO IN PROPRIO

INSACCATI COTTI (salami cotti)  LUOGO DI ACQUISTO MARCA  
 PRODOTTO IN PROPRIO

SALUMI(prosciutti cotti e crudi)  LUOGO DI ACQUISTO MARCA  
 PRODOTTO IN PROPRIO

CARNE SUINA(es.bracirole)  LUOGO DI ACQUISTO MARCA  
 PRODOTTO IN PROPRIO

CARNE DI POLLO  LUOGO DI ACQUISTO MARCA  
 PRODOTTO IN PROPRIO

ALTRI CIBI  LUOGO DI ACQUISTO  
 MARCA   
 PRODOTTO IN PROPRIO

UOVA COTTE  LUOGO DI ACQUISTO MARCA

UOVA CRUDE (maionese, creme, tiramisù)  LUOGO DI ACQUISTO MARCA

VERDURE CRUDE (carote, finocchi)  LUOGO DI ACQUISTO MARCA  
 PRODOTTO IN PROPRIO

**CONTATTO CON ANIMALI DOMESTICI**

CN- GT  
 CV-BV  
 VOLATILI (piccioni, pappagalli, galline, etc)  
 A. ESOTICI (tartarughe, iguane, conigli, criceti)

**ACCESSO A GIARDINI** (pubblici/ giardino casa/ cortili/ orto)

**FREQUENTAZIONE DI SCUOLE/ CIRCOLI/ COMUNITA'**

## Bibliografia

- Hunter, S.B; Vauterin, P.; Lambert-Fair, M.A.; Van Duynne, M.S.; Kubota, K.; Graves, L.; Wrigley, D.; Barrett, T.; Efrain Ribot, E. (2005). Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1045–1050
- Isakbaeva E, Lindstedt BA, Schimmer B, Vardund T, Stavnes TL, Hauge K, Gondrosen B, Blystad H, Kløvstad H, Aavitsland P, Nygård K, Kapperud G. Salmonella Typhimurium DT104 outbreak linked to imported minced beef, Norway. *Euro Surveill*. 2005;10(11):051110.
- Khan, A.A.; Nawaz, M.S.; Khan, S.A.; Cerniglia, C.E. (2000). Detection of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters*, 182, 355-360.
- Lim, Y.H.; Hirose, K.; Izumiya, H.; Arakawa, E.; Takahashi, H.; Terajima, J.; Itoh, K.; Tamura, K.; Kim, S.I.; Watanabe, H. (2003). Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 56, 151-5.
- Peters TM, Maguire C, Threlfall EJ, Fisher IS, Gill N, Gatto AJ. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro Surveill*. 2003; 8:46-50.
- Rahn, K.; De Grandis, S.A.; Clarke, R.C.; Gala'n, J.E.; Ginocchio, C.; Curtiss III, R.; Gyles, C.L.. (1992) . Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 271–279.
- Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7:382-9.