

DIAGNOSI CLINICA E DEFINIZIONE DI CASO

Criteri clinici	Tempi di incubazione 1-40 giorni Almeno una delle cinque seguenti manifestazioni: - febbre - meningite, meningoencefalite o encefalite - sintomi di tipo influenzale - setticemia - infezioni localizzate quali artrite, endocardite, endoftalmite e ascessi. Listeriosi in gravidanza - Aborto spontaneo - Parto di feto morto o parto prematuro durante la gravidanza		Listeriosi neonatale - parto di feto morto (morte fetale dopo 20 settimane di gestazione) - parto prematuro (prima di 37 settimane gestazionali) <i>oppure</i> Almeno una delle cinque seguenti manifestazioni nel primo mese di vita: -meningite o meningoencefalite - setticemia - dispnea - granulomatosi infantisettica - lesioni cutanee, mucose o congiuntivali.		
Criteri epidemiologici	Trasmissione da alimento a uomo  - Alimenti crudi di origine animale e vegetale e non sottoposti a idoneo trattamento di risanamento (es. latte crudo o carne cruda) - Alimenti pronti al consumo, quali alimenti cotti o lavorati e contaminati dopo il risanamento - Latte crudo, formaggi formaggi molli, gelati - Pesci crudi o affumicati e derivati (molluschi, salmone e altri pesci affumicati) - Salumi (salsicce, salami, wurstel).	Trasmissione interumana 	Trasmissione da animale a uomo 	Esposizione a una fonte comune	
CASO PROBABILE: qualsiasi persona che soddisfi i criteri clinici e presenti una correlazione epidemiologica					

**Conferma di laboratorio
(1° istanza)**

TIPO DI CAMPIONE: LIQUIDO CEFALO-RACHIDIANO

Modalità di prelievo

- Prelevare mediante puntura lombare (PL) o rachicentesi nello spazio tra la 4^a e la 5^a vertebra lombare una quantità adeguata
- Raccogliere in provette sterili con tappo a vite e fondo conico e in provetta da emocoltura 1 ml
- Dividere in 3 aliquote per ridurre la contaminazione di sangue proveniente dai tessuti perforati
- Effettuare prima dell'inizio della terapia antibiotica



Modalità di trasporto e conservazione

Conservare i campioni di liquor a 3±1 °C per non più di 72 ore, oppure congelare a -80°C (in questo caso i campioni possono essere conservati fino a 6 mesi)



Tipo di esame

1. Esame colturale
2. Metodiche di biologia molecolare



TIPO DI CAMPIONE: SANGUE

Modalità di prelievo

- Prelievo effettuato nel rispetto delle norme di asepsi
- Prelevare quantità sufficiente di sangue in appositi flaconi contrassegnati contenenti brodi per emocoltura (10ml per gli adulti, 5ml per i bambini)
- Prelievo da effettuare prima dell'inizio della terapia antimicrobica



Modalità di trasporto e conservazione

- Inviare i campioni per emocoltura al laboratorio nel più breve tempo possibile e conservarli a temperatura ambiente per non più di 16-18 ore oppure incubati a 35-37°C. I campioni non vanno refrigerati
- I campioni non vanno refrigerati



Tipo di esame

1. Esame colturale
2. Metodiche di biologia molecolare



Criteri di laboratorio

- Isolamento di *Listeria monocytogenes* o identificazione dell'acido nucleico della *Listeria monocytogenes* da siti normalmente sterili
- In un caso associato a gravidanza: Isolamento di *Listeria monocytogenes* o identificazione dell'acido nucleico della *Listeria monocytogenes* in un sito solitamente non sterile (es. tessuto placentare, liquido amniotico, meconio, tampone vaginale) o in un feto, in un feto nato morto, in un neonato o nella madre entro 24 ore dal parto



CASO CONFERMATO: Qualsiasi persona che soddisfi i criteri di laboratorio. In un caso associato a gravidanza (madre o neonato nel primo mese di vita) che soddisfi i criteri di laboratorio, solo la madre deve essere dichiarata come caso. *Nota:* se il sistema nazionale di sorveglianza non registra i sintomi clinici, tutti i casi confermati in laboratorio devono essere dichiarati come casi confermati.

Conferma di laboratorio (2° istanza)

TIPO DI CAMPIONE: CEPPO BATTERICO

Modalità di prelievo	Ceppo batterico isolato in appositi terreni (es. ALOA Agar, OXFORD agar, Agar sangue).	
Modalità di trasporto e conservazione	I ceppi batterici vanno trasportati al laboratorio nel più breve tempo possibile e conservati alla temperatura di 4°C.	
Tipo di esame	Metodiche di biologia molecolare MLST (Multilocus sequence typing)	

DIAGNOSTICA DI PRIMA ISTANZA

Esame colturale

Valutare l'aspetto macroscopico del liquido cefalo rachidiano attraverso la conta cellulare e la colorazione di Gram. Centrifugare il liquido cefalo rachidiano ed inoculare il sedimento ottenuto in piastre di terreno selettivo (Oxford agar, Aloa Agar, Rapid L.Mono agar), terreno non selettivo (Agar Sangue, Columbia agar, agar cioccolato) e terreno liquido (Trypticase soy broth, Brain heart infusion or Listeria enrichment broth). In caso di utilizzo di terreno colturale solido, è consigliabile lasciare asciugare l'inoculo prima di diffonderlo con un'ansa sterile. Incubare le piastre per 72 ore a 37°C in aerobiosi e con il 5% di CO₂.

I campioni di feci sono di uso limitato e non raccomandati per la diagnosi, le feci devono essere esaminate in caso sia sospettata una forma di listeriosi gastroenterica. *Listeria monocytogenes* è di agevole isolamento sui terreni di coltura, i terreni selettivi permettono un isolamento ancora più agevole nel caso si abbia a che fare con materiali contaminati.

Specifiche tecniche

DIAGNOSTICA DI SECONDA ISTANZA

Metodiche di biologia molecolare

Le tecniche di caratterizzazione molecolare si basano sull'analisi di porzioni più o meno estese del DNA batterico ottenuto da colonie cresciute su terreni colturali solidi. Il laboratorio utilizzerà i metodi che sono in uso al fine di confermare dapprima l'identificazione di specie (PCR di specie, sierogruppo) e successivamente altre prove che permettono di identificare cluster batterici (Sierogruppo, PFGE, MLST e WGS). L'estrazione del DNA può essere effettuata mediante bollitura o altro metodo in uso in laboratorio, l'amplificazione delle sequenze geniche mediante primers specifici e valutazione della positività o negatività del campione mediante elettroforesi su gel di agarosio e lettura al transilluminatore oppure per elaborazione automatica con elaborazione di curve di fluorescenza, il sequenziamento (MLST) o mediante tecniche di sequenziamento dell'intero genoma (WGS). L'utilizzo della PFGE consente, mediante il confronto delle caratteristiche genomiche, di fornire indicazioni relative alla clusterizzazione degli isolati di *Listeria monocytogenes*. In laboratorio sono utilizzate sempre più le metodiche che permettono il sequenziamento dell'intero genoma (WGS).