

FULL PAPERS

Listeria monocytogenes infection in pregnancy and neonatal sepsis

Francesca Pascale, Vincenzo Rondinelli, Vittorio Focarelli, Raffaele Saraceno, Manuela Colosimo, Stefania Giglio, Maria Giuseppina Pascale, Nicola Iiritano, Giovanna Caruso, Antonio Marino, Francesco Caligiuri, Giacomo Fabiano, Melania Dragone, Ugo Mazzei, Rosanna Masciari

Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio, Presidio Pugliese, Via Pio X, 88100 Catanzaro

Listeria monocytogenes infection in pregnancy and neonatal sepsis

Key words: Listeriosis, Pregnancy, Vaginal swab, Neonatal sepsis

SUMMARY

Authors report a fatal neonatal sepsis caused by *Listeria monocytogenes*. While the diagnostic procedure aimed to identify the microorganism is described, it is emphasized the importance to recover *Streptococcus agalactiae* (GBS) and *L. monocytogenes* by means of vaginal-rectal swab culture.

The intrapartum screening for *L. monocytogenes*, by Polymerase Chain Reaction (PCR) providing results in 75 minutes is also evaluated.

Received October 30, 2006

Accepted April 16, 2007

INTRODUZIONE

Il genere *Listeria* appartiene alla famiglia delle *Listeriaceae* e comprende 6 specie. Le *Listerie* sono bacilli pleomorfi Gram positivi, asporigeni, microaerofili (figura I). La *Listeria monocytogenes* è l'unica patogena sia per l'uomo che per gli animali e causa infezioni di diversa natura, genericamente dette listeriosi, che sono più frequenti nelle donne gravide, nei neonati (8), nei bambini, negli anziani e nei soggetti immunocompromessi.

Anche se le modalità di trasmissione di *L. monocytogenes* sono varie, (trasmissione verticale da madre a figlio, contatto tra animale e uomo, infezioni nosocomiali), la malattia nell'uomo è provocata per lo più dal consumo di alimenti contaminati (4). In natura il microorganismo si ritrova nel suolo, nei liquami e nelle acque superficiali. Da queste fonti si diffonde nella catena alimentare. Essendo *Listeria monocytogenes* un microrganismo psicrotrofo, che cresce in un intervallo di temperatura compreso tra 0 e 45°C, gli alimenti che costituiscono il rischio maggiore di trasmissione sono i prodotti conservati a temperatura di refrigerazione ma consumati senza essere sottoposti a

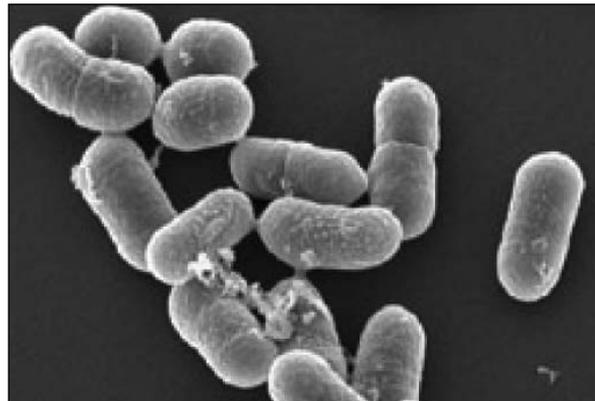


Figura I. *L. monocytogenes* (Microscopia Elettronica)

riscaldamento o cottura (latte crudo e prodotti derivati, insaccati, alcuni prodotti della pesca e ortaggi) (1).

Le donne in gravidanza, secondo i dati del Centro Americano di Controllo delle Malattie, sono 20 volte più suscettibili alla malattia: il cambiamento ormonale ha un effetto sul sistema immunitario delle gestanti tale da comportare un aumento della sua sensibilità alla listeriosi (3).

La dose infettiva è piuttosto bassa: 100 cellule

Corresponding author: Rosanna Masciari

Via Luigi Pascali, 30 - 88100 Catanzaro

Tel.: 0961 725069 - Fax: 0961 883490 - E-mail r.masciari@tele2.it

batteriche per grammo di cibo contaminato sono in grado di causare l'infezione.

Il batterio, entrato nell'organismo per via alimentare, ha come primo bersaglio il fegato da dove si diffonde (6) agli altri distretti (1-7). Nel fegato il germe si moltiplica attivamente e l'infezione è tenuta sotto controllo non dagli anticorpi (che si accumulano nel sangue e nella linfa e non riescono a raggiungere il batterio), ma da una risposta cellulo-mediata. Questa prima fase della listeriosi decorre in forma subclinica e soltanto in alcuni casi (relativi a donne gravide e a soggetti immunocompromessi) l'equilibrio tra il batterio annidato nel fegato e le resistenze immunitarie dell'ospite si spezza e la condizione di "infezione listeriosa" (5) degenera nella forma clinica evidente.

DESCRIZIONE DEL CASO

Un nato a termine da parto spontaneo presenta indice di Apgar 10 al primo ed al quinto minuto. La madre, subito dopo il parto, manifesta febbre a 40°C, resistente agli antipiretici, ma sensibile all'antibiototerapia. A 18 ore di vita il piccolo viene trasferito in Terapia Intensiva Neonatale per ingravescente gemito espiratorio ed ipertermia. Per la comparsa di episodi subentranti di apnea viene posto in pressione positiva continua (CPAP) con cannula nasofaringea e, per il sospetto diagnostico di sepsi connatale, viene iniziata una terapia antibiotica. Gli esami ematochimici, inviati già durante la prima giornata di ricovero, mostrano progressivo calo dei globuli bianchi, aumento della Proteina C Reattiva, alterazione delle prove di coagulazione. In seconda giornata si evidenziano un esantema puntiforme non confluyente e secrezioni mucopurulente ad entrambi gli occhi. Per il grave distress respiratorio si rendono necessari l'intubazione ed il collegamento al respiratore meccanico. L'ipertermia è sempre presente. Nell'emocultura e nei tamponi nasale, congiuntivale e auricolare si apprezza la crescita in piastra di colonie simili a quelle di *S. agalactiae* ma catalasi positive (figure III-IV). I vetrini predisposti evidenziano la presenza di coccobacilli Gram positivi. Vengono quindi allestiti altri test supplementari che consentono l'identificazione presuntiva del germe:

- Colorazione di Gram con decolorazione spinta: al microscopio si apprezza la presenza di microrganismi Gram negativi simili ad emofili (figura II);
- Motilità a 25°C: eseguita sia con il metodo della goccia pendente su apposito vetrino concavo nella sua parte centrale e tramite inoculo in terreno SIM in cui la motilità del

batterio si evidenzia con la caratteristica crescita a ombrello sotto la superficie dell'agar;

- Assenza di produzione di H₂S sempre in terreno SIM (la fonte di zolfo è il tiosolfato di sodio) utilizzando come indicatore il ferro peptonizzato;
- Movimento tipico "a capriola" in brodo dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente;
- Fermentazione di glucosio, trealosio e salicina (presente).
- Reazione positiva alla Voges-Proskauer: dopo inoculo di colonie pure in brodo rosso-metile-Voges-Proskauer (MR/VP) ed incubazione per 24 ore a 35°C si trasferisce 1 ml di brodo in un'altra provetta e si aggiungono 0.6 ml di α-naftolo al 5% e successivamente 0.2 ml di KOH al 40%. È essenziale che i reagenti vengano aggiunti nell'ordine indicato. La provetta deve essere delicatamente agitata per esporre il terreno all'ossigeno atmosferico e lasciata a riposo per 10-15 minuti. Si sviluppa un colore rosso che indica la presenza di diacetile derivato dalla trasformazione dell'acetoina in presenza del catalizzatore α-naftolo;
- Idrolisi dell'esculina (positiva);
- Ricerca della catalasi (positiva) su vetrino ed in provetta; (figure VI-VII)
- Produzione del fattore CAMP (figura V) (sigla derivata dalle iniziali dei ricercatori Christie, Atkins e Munch-Peterson), una proteina extracellulare diffusibile prodotta da alcuni microrganismi (come *L. monocytogenes* e la maggior parte degli *Streptococchi di gruppo B*) quando agisce in sinergia con la β-lisina streptococcica. L'esecuzione del CAMP test si effettua seminando in agar sangue il ceppo da identificare con striscio lineare perpendicolare al ceppo di *S. aureus* capace di produrre β-lisina. Le due linee di inoculo non si devono toccare e la piastra deve essere incubata all'aria a 35-37 ± 1°C per 18-24 ore. Si considera positiva per *Listeria monocytogenes* la reazione β-emolitica incrementata dalla produzione del fattore CAMP.

Lo strumento Phoenix della Becton Dickinson conferma l'identificazione presuntiva di *Listeria monocytogenes* e l'antibiogramma consente la terapia specifica con amikacina e ampicillina mentre quella empirica era basata sull'uso di amikacina e cefalosporine, queste ultime non efficaci sulle listerie. In quarta giornata si registra comunque l'exitus.

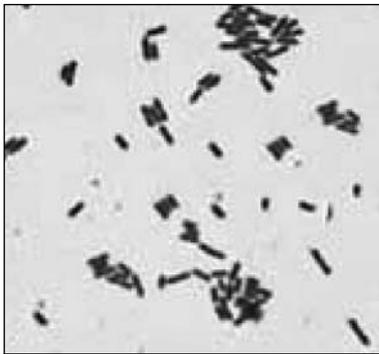


Figura II. *L. monocytogenes*, colorazione di Gram

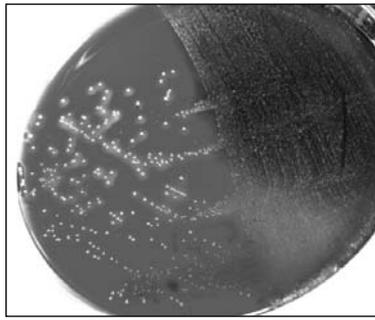


Figura III. *L. monocytogenes* su Agar-Columbia

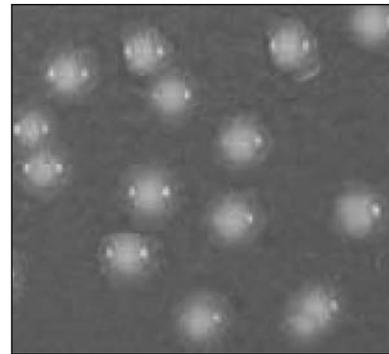


Figura IV. Particolare ingrandito delle colonie di *L. monocytogenes*

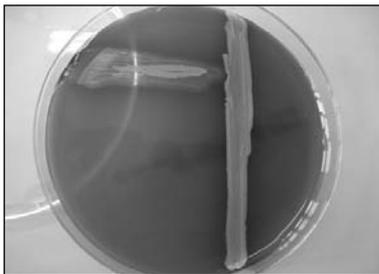


Figura V. Produzione del fattore CAMP



Figura VI. Ricerca della catalasi (positiva) in provetta

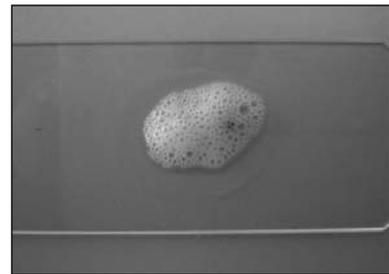


Figura VII. Ricerca della catalasi (positiva) su vetrino

CONCLUSIONI

L'opportunità di attuare campagne di informazione sulla sicurezza alimentare (2) per le donne in gravidanza è ancora oggi argomento di confronto tra le varie anime del mondo scientifico perchè coloro che si occupano di sicurezza alimentare hanno una differente percezione della problematica rispetto a ginecologi e microbiologi clinici. Le campagne informative certamente potrebbero ridurre i rischi, ma indubbiamente susciterebbero nelle donne eccessivi allarmismi ed ansie ingiustificate dal momento che il numero degli isolamenti positivi di *L. monocytogenes* da varie categorie di alimenti è di gran lunga superiore a quello dei casi clinici di listeriosi annualmente censiti.

Nelle donne gravide piuttosto, tra la 35^a e la 37^a settimana di gestazione, deve essere effettuata la ricerca, oltre che dello *Streptococco agalactiae* (GBS), anche di patogeni meno comuni ma altrettanto temibili come le listerie. È auspicabile che, nel periodo intrapartum, il metodo di rilevamento rapido della colonizzazione da GBS nelle donne non precedentemente testate su tampone vagino-

rettale -basato sulla Polymerase Chain Reaction (PCR) con risultato in 75 minuti - sia al più presto esteso alla ricerca di *Listeria monocytogenes*.

BIBLIOGRAFIA

1. Berche P. Pathophysiology and epidemiology of listeriosis. Bull Acad Natl Med, 2005; 507-16.
2. Chin J. Control of communicable diseases in man. 17^a ed. American Public Health Association, 2000.
3. Cito G, Luisi S, Faldini E, et al. Listeriosis in pregnancy: a case report. Matern Fetal Neonatal Med, 2005; 367-8.
4. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Micr Rev, 1991; 476.
5. Gierowska-Boqusz B, Nowicka K, Drejewicz H. Clinical and laboratory diagnosis of *Listeria monocytogenes*. Med Wieku, 2000; 89-96.
6. O'Neil HS, Marquis H. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesions, to increase host cell invasion. Infect Imm, 2006.
7. Rouquette C, Berche P. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. Microbiologia, 1996; 245-58.
8. Van Stuijvenberg M, Spanjaard L, Bergman KA. Neonatal infection with *Listeria monocytogenes*: rare, but serious. Ned Tijdschr Geneesk, 2006; 105-7.