

**ELiTE (European *Listeria* Typing Exercise)**  
**Progetto europeo di integrazione tra dati umani e  
veterinari nell'epidemiologia molecolare  
della *Listeria monocytogenes***

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

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

Teramo, 11-13 dicembre 2013

Monica Gianfranceschi  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare  
Istituto Superiore di Sanità

# COMMISSION DECISION

of 5 November 2010

## concerning a financial contribution from the Union towards a coordinated monitoring programme on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods to be carried out in the Member States

La Decisione stabilisce che:

- gli Stati Membri devono effettuare un programma coordinato di sorveglianza della durata di 12 mesi sulla prevalenza di *Listeria monocytogenes* in alcune categorie di alimenti pronti al consumo (pesce affumicato confezionato, formaggio molle e semi-molle, prodotti carnei trattati termicamente e confezionati) da prelevare a livello della vendita al dettaglio
- il prelievo deve essere effettuato dall'autorità competente o sotto la sua supervisione
- i Laboratori Nazionali di Riferimento per *Listeria monocytogenes* devono effettuare le analisi per la ricerca e numerazione di *Listeria monocytogenes* e per la determinazione del pH e dell'Aw
- l'autorità competente possono designare altri laboratori accreditati coinvolti nei controlli ufficiali di *Listeria monocytogenes* per effettuare le suddette analisi
- le analisi per la ricerca e numerazione della *Listeria monocytogenes* devono essere eseguite alla fine della shelf-life degli alimenti, stoccandoli +4°C dall'arrivo in lab fino all'esecuzione delle analisi; per il pesce affumicato è prevista un'ulteriore analisi anche all'arrivo dell'alimento in laboratorio
- Per ogni campione positivo, un ceppo di *Listeria monocytogenes* deve essere conservato per eventuali ulteriori studi di tipizzazione. Gli isolati devono essere stoccati dai Laboratori Nazionali di Riferimento utilizzando metodi adeguati che garantiscano la vitalità dei ceppi per un minimo di due anni.

## ANNEX II

**Number of samples to be taken per ready-to-eat food category in the Member States**  
(referred to in Article 4(5))

Member State	Population on 1.1.2008 (Eurostat data)		Harmonised stratified sample size	
	N (million)	%	Per food category and analysis stage (*)	Total sample size
Belgium — BE	10,7	2,1	60	240
Bulgaria — BG	7,6	1,5	60	240
Czech Republic — CZ	10,4	2,1	60	240
Denmark — DK	5,576	1,1	60	240
Germany — DE	82,2	16,5	400	1 600
Estonia — EE	1,3	0,3	30	120
Ireland — IE	4,4	0,9	30	120
Greece — EL	11,2	2,3	60	240
Spain — ES	45,3	9,1	200	800
France — FR	63,8	12,8	400	1 600
Italy — IT	59,6	12,0	400	1 600
Cyprus — CY	0,8	0,2	30	120
Latvia — LV	2,3	0,5	30	120
Lithuania — LT	3,4	0,7	30	120
Luxembourg — LU	0,5	0,1	30	120
Hungary — HU	10,0	2,0	60	240
Malta — MT	0,4	0,1	30	120
Netherlands — NL	16,4	3,3	60	240
Austria — AT	8,3	1,7	60	240
Poland — PL	38,1	7,7	200	800
Portugal — PT	10,6	2,1	60	240
Romania — RO	21,5	4,3	60	240
Slovenia — SI	2,0	0,4	30	120
Slovakia — SK	5,4	1,1	60	240
Finland — FI	5,3	1,1	60	240
Sweden — SE	9,2	1,8	60	240
United Kingdom — UK	61,2	12,3	400	1 600
Total EU	497,5	100,0	3 020	12 080

(\*) For smoked and gravad fish: two samples are collected from each batch. One of these samples is analysed on the day of receipt at the laboratory and the other one is analysed at the end of the shelf-life (see point 1.2 of part C of Annex I).

## Programma di monitoraggio condotto in Italia (Marzo 2011- Aprile 2012)

Categorie alimentari	Numero di campioni (1)
Formaggi (2)	398
Prodotti carnei (3)	403
Prodotti ittici (4) (analizzati all'arrivo in laboratorio)	389
Prodotti ittici (4) (analizzati alla fine della shelf life)	389

- (1) 1579 campioni prelevati al dettaglio in 12 città (MI, TO, VR, BO, GE, FI, RM, NA, CA, BA, PA, CT) del nord, centro e sud Italia.
- (2) Formaggi molli e semi molli (brie, caciotte, camembert, gorgonzola, italico, quartirolo, stracchino, crescenza, taleggio)
- (3) Prodotti carnei trattati termicamente prima del confezionamento (arrosto, mortadella, prosciutto cotto, spalla cotta)
- (4) Prodotti ittici affumicati, confezionati sotto vuoto o in atmosfera modificata (salmone affumicato, pesce spada affumicato)

## SCIENTIFIC REPORT OF EFSA (2013)

### 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 estimates

This study was the eighth in a series of baseline surveys carried out within the EU.

It was the first baseline survey directly investigating foodstuffs at retail and it was also the first baseline survey enabling the estimation of the prevalence only at the EU level-not at Member State level.

Coupled with the RTE nature of the foods sampled, and the quantitative component of the survey test results, this survey came much closer to the point of consumption than previous surveys. Thus, this survey approaches the concept of risk arising from this hazard to which the EU consumer of these products might be exposed.

However this survey targets *L. monocytogenes* in RTE food products previously shown to be at risk of contamination, and does not consider consumption of surveyed products; thus it is not an exposure assessment.

# SCIENTIFIC REPORT OF EFSA (2013)

## 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 estimates

The *Listeria monocytogenes* prevalence across the entire European Union was:

- 10.4% in fish samples at the time of sampling
- 10.3% in fish samples at the end of shelf life
- 2.07% in meat products at the end of shelf life
- 0.47% in cheese at the end of shelf life

The European Union level proportion of samples with a *Listeria monocytogenes* count exceeding the level of 100 cfu/g was:

- 1.0% for fish samples at the time of sampling  
[0.7% (100-1000 cfu/g); 0.2% (1000-10.000 cfu/g); 0.1% (10.000-100.00 cfu/g); 0.1% (>100.000cfu/g)]
- 1.7% for fish samples at the end of shelf life  
[0.9% (100-1000 cfu/g); 0.4% (1000-10.000 cfu/g); 0.3% (10.000-100.00 cfu/g); 0.1% (>100.000cfu/g)]
- 0.43% for meat samples at the end of shelf life  
[0.3% (100-1000 cfu/g); 0.03% (1000-10.000 cfu/g); 0.1% (10.000-100.00 cfu/g); 0% (>100.000cfu/g)]
- 0.06% for cheese samples at the end of shelf life  
[0% (100-1000 cfu/g); 0.03% (1000-10.000 cfu/g); 0.03% (10.000-100.00 cfu/g); 0% (>100.000cfu/g)]

# SCIENTIFIC REPORT OF EFSA (2014)

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

### Part B

Nel giugno 2014 verrà pubblicato dall'EFSA un report che conterrà:

- l'analisi dei fattori di rischio associati alla prevalenza di *Listeria monocytogenes* negli alimenti contaminati
- lo sviluppo di modelli predittivi per calcolare la crescita di *Listeria monocytogenes* negli alimenti sottoposti a sorveglianza in diverse condizioni di stoccaggio
- lo sviluppo di modelli predittivi per valutare la conformità degli alimenti sottoposti a sorveglianza ai limiti stabiliti dal Regolamento CE 2073:2005

Tale report si baserà sui risultati dell'analisi statistica del baseline survey, eseguita dall'Istituto di Biostatistica e Bioinformatica dell'Università di Hasselt in Belgio, pubblicati nel 2013 (**External Scientific Report**).

# Sorveglianza microbiologica ed epidemiologica di alcune zoonosi

## Le sei priorità individuate dall'ECDC nell'ambito delle Food-and Water-borne Diseases

DIRETTIVA 2003/99/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 novembre 2003  
sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici (recepita con D. L.vo 191:2006)

### ALLEGATO I

#### A. Zoonosi ed agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza

- Brucellosi e relativi agenti zoonotici
- Campilobatteriosi e relativi agenti zoonotici
- Echinococcosi e relativi agenti zoonotici
- Listeriosi e relativi agenti zoonotici
- Salmonellosi e relativi agenti zoonotici
- Trichinellosi e relativi agenti zoonotici
- Tubercolosi causata da *Mycobacterium bovis*
- *Escherichia coli* che produce verocitotossine

#### B. Elenco delle zoonosi e degli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica

##### 1. Zoonosi virali

- Calicivirus
- Virus dell'epatite A
- Virus dell'influenza
- Rabbia
- Virus trasmessi da artropodi

##### 2. Zoonosi batteriche

- Borreliosi e relativi agenti zoonotici
- Botulismo e relativi agenti zoonotici
- Leptosirosi e relativi agenti zoonotici
- Psittacosi e relativi agenti zoonotici
- Tubercolosi diverse da quella di cui alla parte A
- Vibriosi e relativi agenti zoonotici
- Yersiniosi e relativi agenti zoonotici

##### 3. Zoonosi da parassiti

- Anisakiasis e relativi agenti zoonotici
- Criptosporidiosi e relativi agenti zoonotici
- Cisticercosi e relativi agenti zoonotici
- Toxoplasmosi e relativi agenti zoonotici

##### 4. Altre zoonosi ed agenti zoonotici



## **Sorveglianza microbiologica ed epidemiologica delle zoonosi**

### **Le sei priorità individuate dall'ECDC nell'ambito delle Food-and Water-borne Diseases**

- Campilobatteriosi
- Escherichia coli verocitossico
- Listeriosi
- Salmonellosi
- Shigellosi
- Yersiniosi

Per tali zoonosi l'ECDC prevede che ogni Stato Membro trasmetta a TESSy (The European Surveillance System) **dati epidemiologici e microbiologici (sierotipo)**.

In particolare per la listeriosi è prevista la trasmissione dei seguenti dati epidemiologici:

- Età
- Sesso
- Manifestazione clinica
- Data inizio sintomi
- Data diagnosi
- Data di notifica
- Ospedalizzazione
- Esito
- Trasmissione (alimento, madre-figlio)
- Alimento sospetto
- Caso domestico/importato



## NOTE TO THE MEMBERS OF THE STANDING COMMITTEE ON THE FOOD CHAIN AND ANIMAL HEALTH

Subject: Possible use of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) subtyping for comparing *Listeria monocytogenes* isolates from food coordinated monitoring program with human isolates collected in the same period

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) explored the interest in the public health authorities to participate in a joint exercise. The project idea was discussed with the public health experts in the Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses (FWD) network and the ECDC Advisory Forum (AF) members in 2009. Both AF members and the FWD network were supportive and positive for the project.

In early 2010, ECDC invited public health laboratories in the FWD network to store *Listeria monocytogenes* isolates from human cases that were diagnosed during the food baseline study period. The first meeting with 19 participating countries was held in ECDC on 17th December 2010, and a more detailed plan for the exercise was discussed.

# Raccolta ceppi alimentari ed umani durante il baseline survey in Italia

- Fra marzo 2011 e aprile 2012, il Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*, ha stoccato circa 100 ceppi alimentari isolati dagli IZZSS nelle diverse regioni italiane
- Nello stesso periodo, l'Istituto Superiore di Sanità ha raccolto circa 70 isolati clinici, principalmente inviati da due regioni, Lombardia and Emilia Romagna, nell'ambito del network Food- and Water-borne Diseases dell'ECDC (FWD)

# Food- and Water-borne Diseases - Molecular Surveillance Pilot

Country	Organisation	Contact	Mail address	E coli	Salm	List
BG	National Center of Infectious and Parasitic Diseases	Stefan Panaiotov	<a href="mailto:spanaiotov@yahoo.com">spanaiotov@yahoo.com</a>	✓	✓	
DE	Robert Koch-Institute	Angelika Fruth	<a href="mailto:frutha@rki.de">frutha@rki.de</a>	✓	✓	✓
		Rita Prager	<a href="mailto:pragerr@rki.de">pragerr@rki.de</a>			
DK	Statens Serum Institut	Eva Møller Nielsen	<a href="mailto:emn@ssi.dk">emn@ssi.dk</a>			✓
ES	Instituto de Salud Carlos III	Silvia Herrera León	<a href="mailto:sherrera@isciii.es">sherrera@isciii.es</a>	✓	✓	
FI	Terveuden ja Hyvinvoinnin Laitos	Anja Siitonen	<a href="mailto:anja.siitonen@thl.fi">anja.siitonen@thl.fi</a>		✓	
FR	Institut Pasteur	Marc Lecuit	<a href="mailto:listeria@pasteur.fr">listeria@pasteur.fr</a>			✓
		Alexandre Leclercq	<a href="mailto:listeria@pasteur.fr">listeria@pasteur.fr</a>			
GR	National School of Public Health	Alkiviadis Vatopoulos	<a href="mailto:avatopoulos@esdy.edu.gr">avatopoulos@esdy.edu.gr</a>		✓	
		Georgia Mandilara	<a href="mailto:gmandilara@esdy.edu.gr">gmandilara@esdy.edu.gr</a>			
HR	National Reference Centre for Listeria	Blaženka Hunjak	<a href="mailto:blazenka.hunjak@hzjz.hr">blazenka.hunjak@hzjz.hr</a>			✓
	Croatian National Institute of Public Health	Višnja Kružičević	<a href="mailto:visnja.kruzicevic@hzjz.hr">visnja.kruzicevic@hzjz.hr</a>	✓	✓	
IE	Health Service Executive	Martin Cormican	<a href="mailto:martin.cormican@hse.ie">martin.cormican@hse.ie</a>		✓	✓
IT	Istituto Superiore di Sanità	Ida Luzzi	<a href="mailto:ida.luzzi@iss.it">ida.luzzi@iss.it</a>		✓	
		Alfredo Caprioli	<a href="mailto:alfredo.caprioli@iss.it">alfredo.caprioli@iss.it</a>	✓		
IT	Istituto Superiore di Sanità	Monica Gianfranceschi	<a href="mailto:monica.gianfranceschi@iss.it">monica.gianfranceschi@iss.it</a>			✓
NO	Nasjonalt folkehelseinstitutt	Astrid Louise Wester	<a href="mailto:astrid.louise.wester@fhi.no">astrid.louise.wester@fhi.no</a>		✓	
RO	Institutul Cantacuzino	Maria Damian	<a href="mailto:mdamian@cantacuzino.ro">mdamian@cantacuzino.ro</a>		✓	
	Institutul National de Sanetate Publica	Lavinia Cipriana Zota	<a href="mailto:lavinia.zota@insp.gov.ro">lavinia.zota@insp.gov.ro</a>			
SE	Smittskyddsinstitutet	Cecilia Jernberg	<a href="mailto:cecilia.jernberg@smi.se">cecilia.jernberg@smi.se</a>	✓	✓	
UK	National Health Service Scotland	Mary Hanson	<a href="mailto:mary.hanson@luht.scot.nhs.uk">mary.hanson@luht.scot.nhs.uk</a>			
		John Coia	<a href="mailto:john.coia@ggc.scot.nhs.uk">john.coia@ggc.scot.nhs.uk</a>		✓	

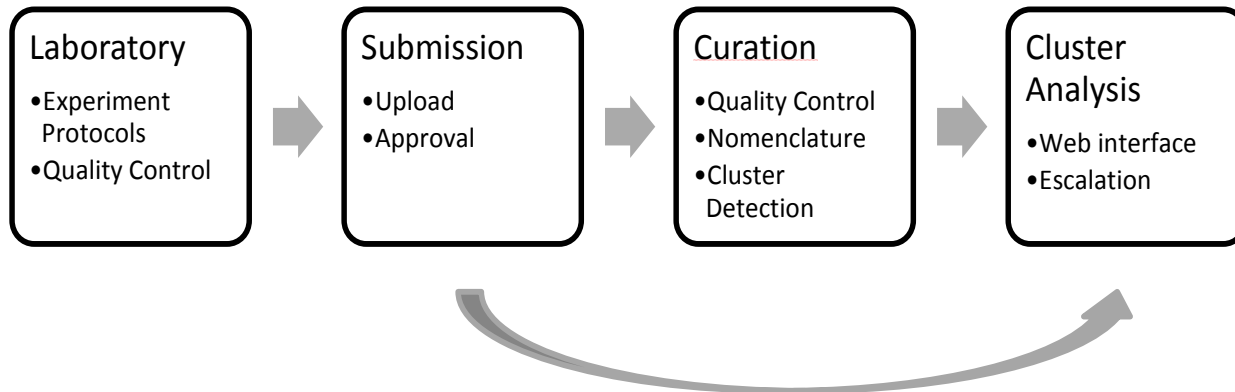
# Food- and Water-borne Diseases Molecular Surveillance Pilot

Gli obiettivi generali della sorveglianza molecolare a livello UE sono:

- Favorire la rapida individuazione di clusters o focolai internazionali
- Facilitare l'individuazione e l'indagine della catena di trasmissione e la relazione fra ceppi a livello europeo ed internazionale.
- Rilevare la comparsa di nuovi ceppi patogeni in continua evoluzione (compresa la resistenza antimicrobica).
- Supportare le indagini per rintracciare (trace-back) la fonte di un focolaio e per individuare nuovi fattori di rischio.
- Facilitare lo studio delle caratteristiche di un particolare agente patogeno e il suo comportamento in una comunità di ospiti.

# Food- and Water-borne Diseases Molecular Surveillance Pilot

L'intero processo, dalla generazione dei dati sperimentali fino alla progressione verso una situazione di potenziale epidemia è coperto da procedure operative standard (SOP), per contribuire a garantire la qualità del sistema



# Food- and Water-borne Diseases Molecular Surveillance Pilot

Piattaforma EPIS (Epidemic Inquiry System) dell'ECDC

**Molecular Typing Cluster Investigation (MTCI)**  **Urgent Inquiry (UI)**

Due profili PFGE sono definiti indistinguibili se non c'è nessuna differenza nelle bande (numero/posizione) sia con l'enzima Apal che con l'enzima Ascl combinati, utilizzando il coefficiente di similitudine Dice, con una tolleranza ed un'ottimizzazione dell' 1 % .

Un cluster (MTC - Molecular Typing Cluster) è definito come uno o più casi in almeno due paesi che presentano isolati con profili PFGE indistinguibili e che si sono verificati entro 16 settimane (112 giorni) e viene inviato agli Stati Membri coinvolti.

Se l'ECDC vuole investigare ulteriormente il cluster, un MTCI (Molecular Typing Cluster Investigation) viene postato nella piattaforma EPIS cui possono accedere tutti i componenti del network FWD che possono segnalare la situazione nel proprio paese.

Il passaggio da MTCI a Urgent Inquiry (UI) avviene nel caso che si verificano settimanalmente un numero crescente di casi per almeno 2 settimane consecutive , nelle ultime 16 settimane, oppure un numero maggiore di 10 casi nelle ultime 16 settimane. L'accesso è consentito ai componenti del network FWD e ognuno può segnalare un aumento di casi registrato nel proprio paese.

# European *Listeria* Typing Exercise

ELiTE ha fornito una opportunità di **collaborazione** tra EFSA , ECDC e il Laboratorio di Riferimento dell'Unione europea per *Listeria monocytogenes* ( EURL Lm ) in termini di raccolta simultanea e rappresentativa di isolati alimentari a livello UE che verranno ulteriormente approfonditi attraverso metodi di tipizzazione molecolare.

Gli **obiettivi generali** sono :

- studiare l' epidemiologia molecolare della listeriosi umana a livello UE
- analizzare la diversità genetica fra ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti e ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da campioni clinici a livello dell'UE
- identificare le associazioni microbiologiche ed epidemiologiche tra i casi umani e gli alimenti RTE, sottoposti a sorveglianza, al fine di valutare il loro potenziale ruolo come fonte di infezioni umane a livello dell'UE .



# European *Listeria* Typing Exercise

- I profili PFGE degli isolati umani e i dati epidemiologici saranno memorizzati nella banca-dati dell'ECDC
- I profili PFGE degli isolati alimentari saranno memorizzati nel database EURL Lm
- Per gli isolati alimentari, la «curation» dei profili PFGE verrà eseguita dai curators dell'EURL Lm ( ANSES)
- Per gli isolati umani, la «curation» dei profili PFGE sarà eseguita dai curators del Statens Serum Institute (Danimarca)
- I dati epidemiologici del baseline survey saranno memorizzati nella banca dati dell'EFSA.
- I dati epidemiologici complessivi provenienti da ECDC, EFSA e EURL Lm saranno analizzati dall'ECDC e dall' EURL L.m. (analisi dei clusters in base alla tipizzazione molecolare)
- Le analisi descrittive saranno eseguite dall' ECDC, e confermate dall'EFSA e dall'EURL L.m.

# European *Listeria* Typing Exercise

- Nell'ambito di ELiTE, un gruppo di studio multi- settoriale di esperti di listeria ( LESG ) sarà istituito e gestito dall' ECDC per fornire consulenza nell'interpretazione e nella presentazione dei risultati.
- Il gruppo di studio sarà composto da esperti provenienti dai settori della sanità pubblica e della sicurezza alimentare degli Stati Membri, curators dei profili PFGE degli isolati umani ed alimentari, un rappresentante dell'OMS ed esperti nel settore della ricerca sulla sicurezza alimentare.
- Il gruppo di studio comprenderà anche i membri del gruppo direttivo di ELiTE: un membro da ciascuna delle tre istituzioni, ECDC , EFSA e EURL Lm .
- Al LESG, in base a necessità specifiche, possono partecipare altri membri o osservatori (esperti di listeria del settore della sicurezza alimentare, esperti di malattie di origine alimentare, membri del network zoonosi)

# Conclusioni

- Il progetto ELiTE ha preso spunto dalla realizzazione di un programma di monitoraggio per verificare la frequenza ed il livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* in alcuni alimenti RTE e dalla contemporanea individuazione da parte dell'ECDC di alcune malattie trasmesse dagli alimenti, fra le quali la listeriosi, per le quali si richiedeva una sorveglianza microbiologica ed epidemiologica più completa.
- Il progetto ELiTE consentirà alle istituzioni europee EFSA ed ECDC, in base alla valutazione dei risultati ottenuti, di estendere tale approccio ad altri importanti patogeni alimentari.
- Il progetto ELiTE rappresenta un'importante possibilità di collaborazione fra due importanti istituzioni nazionali che si occupano rispettivamente di prevenzione delle malattie trasmesse dagli alimenti e di controllo ufficiale degli alimenti.
- La collaborazione stabilita a livello nazionale, nel corso del progetto ELiTE, rappresenta un ottimo punto di partenza per affrontare nella routine le situazioni di emergenza associate alla sicurezza alimentare.
- La creazione di una banca dati nazionale di profili molecolari di isolati umani ed alimentari può essere molto utile per indagare l'eventuale presenza di isolati persistenti o emergenti; per indagare la catena di trasmissione; per effettuare il trace-back.
- E' essenziale che la raccolta di ceppi alimentari ed umani avvenga in maniera continua e che la tipizzazione dei ceppi sia svolta in modo routinario.