

Seminario “Laboratorio Nazionale di Riferimento *Listeria monocytogenes*”

Teramo , 25 Novembre 2014



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Aggiornamenti dal workshop EURL Lm 2014

V. Acciari e C. Marfoggia





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Microbiologia

- **Sierotipizzazione molecolare
e PFGE**

INDICE





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



MICROBIOLOGIA

- ✓ **Comparazione metodi di numerazione per le basse cariche**
- ✓ **Incertezza di misura**
- ✓ **Validazione e revisione EN ISO 11290-1 e 2**





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

NUMERAZIONE *LISTERIA MONOCYTOGENES* – BASSE CARICHE

METODO	
EURL method	French Standard NF V45-008 (2009) Method of enumeration of low level contamination Lm in smoked salmon and trout
Norway NRL protocol	EN ISO 11290-2:98/Amendment 1:2004 modificato (diluizione iniziale 1:2, semina di 2 ml su 4 piastre di ALOA)
Cyprus NRL protocol	EURL method modificato (demi-Fraser addizionato con siero bovino fetale come diluente, inversione dei filtri su piastre di ALOA)

Metodo di riferimento EN ISO 11290-2:98/Amendment 1:2004

Per aumentarne il limite di rilevabilità della ISO sono stati seminati 5 ml su 5 piastre (2ufc/g)



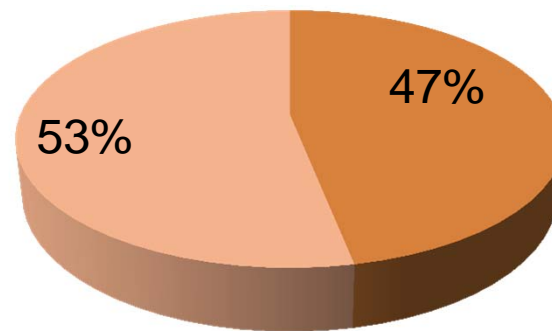


 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

NUMERAZIONE *LISTERIA MONOCYTOGENES* – BASSE CARICHE

Sono stati analizzati 32 campioni naturalmente contaminati ma soltanto 15 di loro hanno prodotto risultati accettabili.





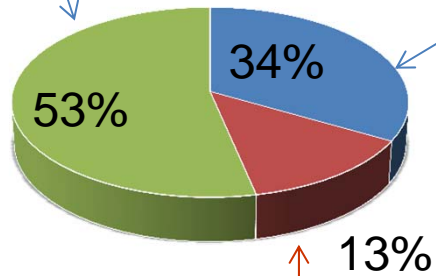
Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

NUMERAZIONE *LISTERIA MONOCYTOGENES* – BASSE CARICHE

Accettabili ... ma

con tutti i metodi

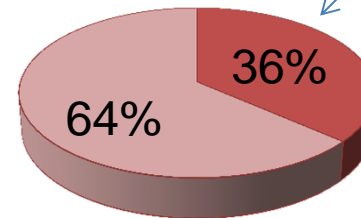


Solo con
metodi in
piastra
(ISO/No)

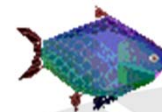
Solo metodo
con filtrazione
(EURL/CY)

Non accettabili

Alta concentrazione di flora
microbica totale



Assenza di *Listeria monocytogenes*



NUMERAZIONE *LISTERIA MONOCYTOGENES* – BASSE CARICHE

	LOD	Vantaggi	Svantaggi
EU-RL method	0,2 ufc/g	<ul style="list-style-type: none"> •buoni risultati con campioni di pesce, carne e vegetali •relativamente rapido facile da implementare ed economico 	<ul style="list-style-type: none"> •problemi di filtrabilità per alcune tipologie di prodotti (prodotti a base di latte)
Cyprus NRL protocol	0,2 ufc/g	simili al metodo EU-RL	<ul style="list-style-type: none"> •simili al metodo EURL •difficoltà con la microflora •difficoltà nel vedere l'alone
Norway NRL protocol	1 ufc/g	<ul style="list-style-type: none"> •rapido e facile •meno piastre del metodo ISO modificato •sviluppo positivo della ISO 	<ul style="list-style-type: none"> •sovrastima della numerazione



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

INCERTEZZA DI MISURA



- ✓ La distribuzione dei microrganismi in alimenti solidi è eterogenea
- ✓ La principale fonte di incertezza di misura negli alimenti solidi è rappresentata dalla preparazione della porzione test





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

INCERTEZZA DI MISURA

Studi sperimentali

Method "dry"

100 g

5*20g (5 spots)

Method "100g"

100 g

5*20g (5 spots)

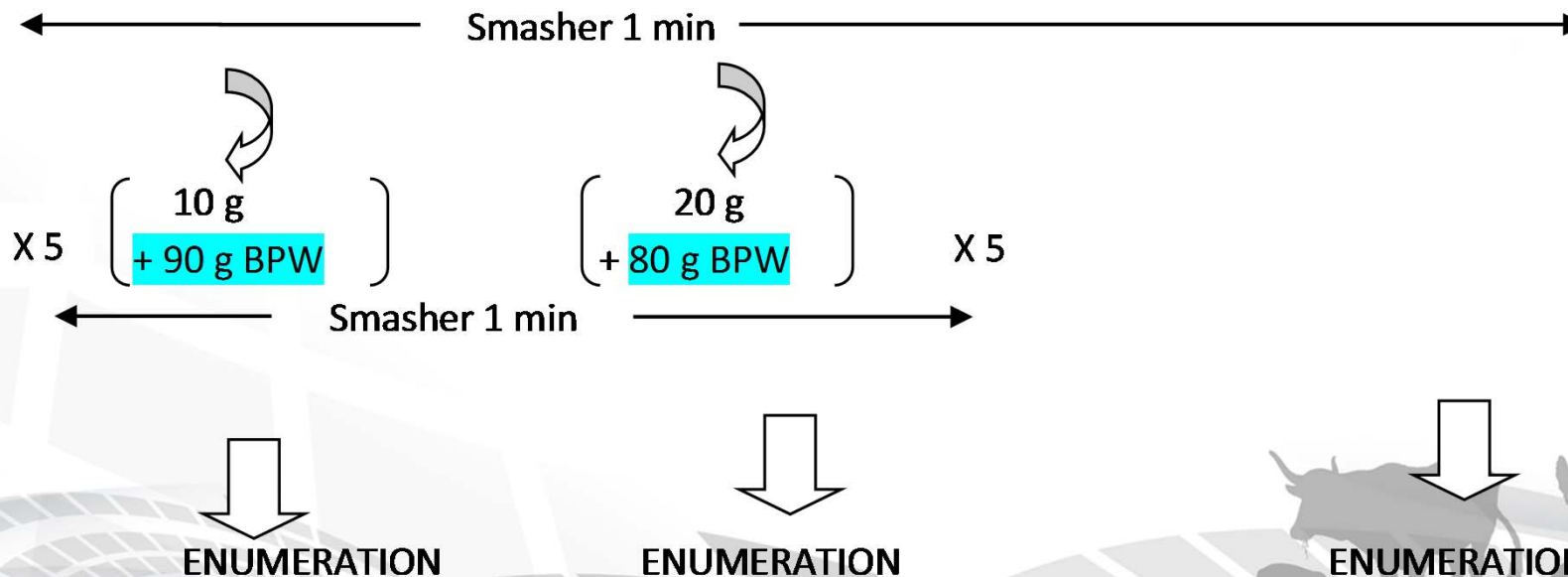
+ 100 g BPW

Method "10g"

10 g

(1 spot)

+ 90 g BPW



MICROBIOLOGIA

INCERTEZZA DI MISURA



Metodo a secco



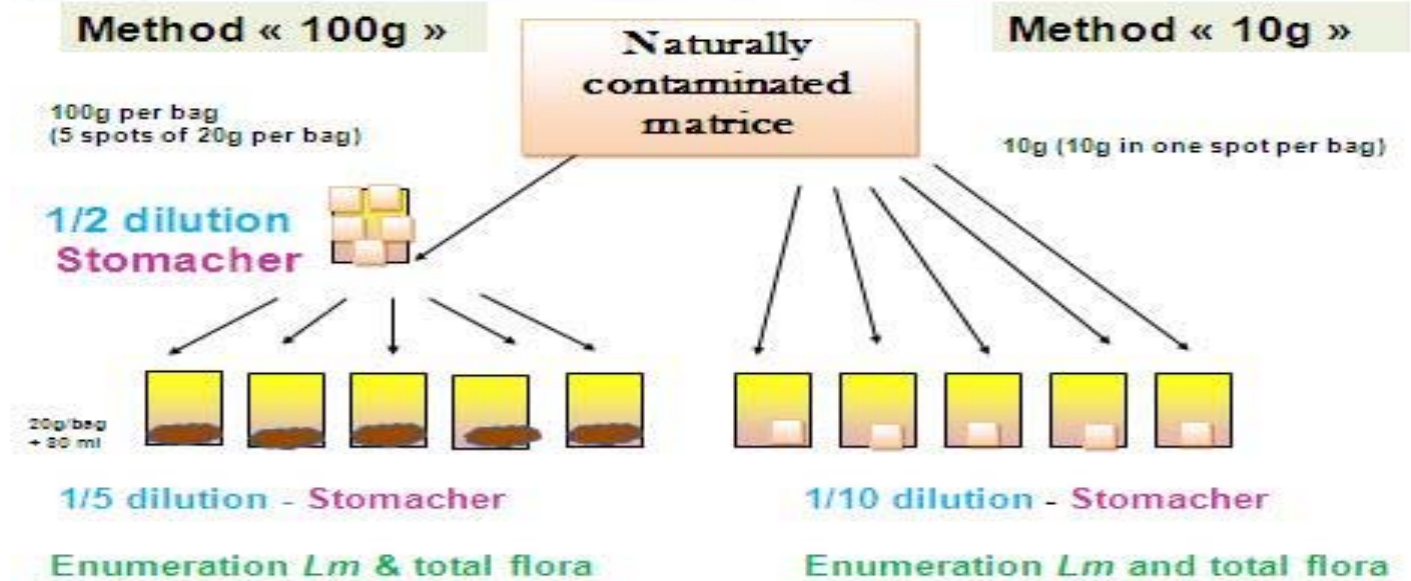
Metodo con diluente



MICROBIOLOGIA

INCERTEZZA DI MISURA

Results « 100g/10g »





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



MICROBIOLOGIA

INCERTEZZA DI MISURA

Proposte EURL:

- ✓ Per migliorare l'incertezza di misura ed ottenere dei risultati realistici nella numerazione il metodo "100 g" è risultato il migliore
- ✓ Sono ancora in corso studi di fattibilità e tavoli di discussione
- ✓ Proposta al WG 8 ISO/TC34/SC9 sulla revisione EN ISO 6887-1: modifica sulla quantità minima della porzione di test da 10g a 25 g






 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

VALIDAZIONE EN ISO 11290-1 E 2

 ✓ Mandato M381/CEN/2010 per la validazione e nel 2013 sono stati organizzati 5 studi interlaboratorio su 5 matrici differenti:

- ✓ **Prodotti a base di Latte (Formaggi crudi)**
- ✓ **Vegetali (Insalate ready-to-eat)**
- ✓ **Pesce (Salmone affumicato)**
- ✓ **Latte in polvere**
- ✓ **Tamponi ambientali**





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

VALIDAZIONE EN ISO 11290-1 E 2

EN ISO 11290-1 Sensibilità e specificità

	Blanks (specificity %)	Low level (sensitivity %)	High level (sensitivity %)
Cold-smoked salmon	100	100	100
Environment	100	99,1	99,1
Ready to eat salad	97,6	100	100
Powdered infant food formula	100	99,2	100
Cheese	100	91,1	100

LOD 50%

La media dei valori ottenuti sono quelli dell' amended EN ISO 11290-1 Standard (2004)





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



MICROBIOLOGIA

VALIDAZIONE EN ISO 11290-1 E 2

EN ISO 11290-2 Precisione

Reproducibility Standard Deviation (\log_{10} cfu/g) for:	Low level	Medium level	High level
Cold-smoked salmon	0,18	0,19	0,19
Environment	0,19	0,19	0,13
Ready to eat salad	0,13	0,09	0,11
Powdered infant food formula	0,25 ★	0,10	0,07
Cheese	0,11	0,18	0,10

★ L'alto valore può essere dovuto alla formazione di micro-aggreganti durante le fasi di contaminazione e cellule stressate dalla liofilizzazione nonché dal basso livello di inoculo

I valori di Sr e SR sono risultati molto vicini





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



MICROBIOLOGIA

REVISIONE EN ISO 11290-1 E 2

✓ *Listeria* spp.

✓ Tamponi ambientali



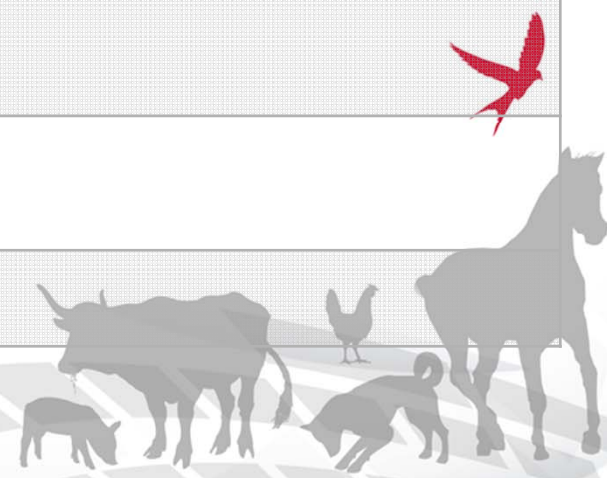


 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

MICROBIOLOGIA

REVISIONE EN ISO 11290-1 E 2

EN ISO 11290-1	EN ISO 11290-2	ENTRAMBE
Primo arricchimento Demi-Fraser broth: un minimo di 24 ± 2 h di incubazione in casi di stress o bassi livelli di contaminazione di <i>Listeria</i> spp. nel campione	Demi-Fraser broth con e senza supplemento	Ramnosio e Xilosio incubazione 24-48 h
Secondo arricchimento Fraser broth: 24 ± 2 h di incubazione; in caso di ricerca di <i>Listeria</i> spp. <i>Incubare per altre 24 h</i>	Eliminare lo step di rivitalizzazione	Può essere usato sangue defibrinato di pecora, vitello o bovino per l'agar sangue
Demi-Fraser e Fraser broth possono essere refrigerati per 72 h dopo l'incubazione se validato dalla ditta o dal laboratorio in accordo con la ISO 16140-3	Numero massimo di colonie da contare 150 e in caso di colture miste meno di 100 colonie caratteristiche per <i>Listeria</i> spp.	Per il test dell'emolisi la colonia viene strisciata su agar sangue
Dopo incubazione le piastre possono essere refrigerate per un massimo di 2 giorni prima della lettura		
Se il campione è positivo deve essere confermata una sola colonia		



MICROBIOLOGIA

REVISIONE EN ISO 11290-1 E 2

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria spp.</i>
ALOA	Gram , catalasi, mobilità e Camp-test (opzionali)	Catalasi, mobilità (opzionali)
	Emolisi, Ramnosio, Xylosio	Gram e Voges Proskauer
Secondo terreno	Camp-test (opzionale)	Catalasi, mobilità (opzionali)
	Emolisi, Ramnosio, Xylosio e Gram	Gram e Voges Proskauer

- ✓ inseriti altri test per l'identificazione della *Listeria spp.*
- ✓ inseriti i risultati della validazione e valori del LOD₅₀
- ✓ Espressione del risultato: Presente/ Assente in 25 g



Sierotipizzazione molecolare

Comparazione tra i 3 protocolli disponibili

Protocollo	Markers in comune	Markers molecolare specifico per ciascun protocollo
Doumith <i>et al.</i> , 2004	<i>lmo0737 ; lmo118 ; ORF2819 ; ORF2110 ; prs</i> (specifico Listeria)	/
Kerouanton <i>et al.</i> , 2010		<i>-prfA</i> (specifico <i>monocytogenes</i>) <i>-flaA</i>
Aggiornamento EURL protocollo		<i>prfA</i>



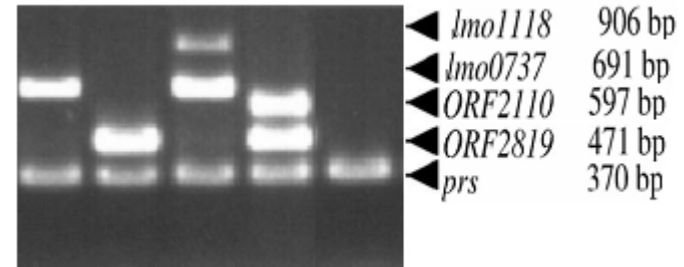


 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Sierotipizzazione molecolare

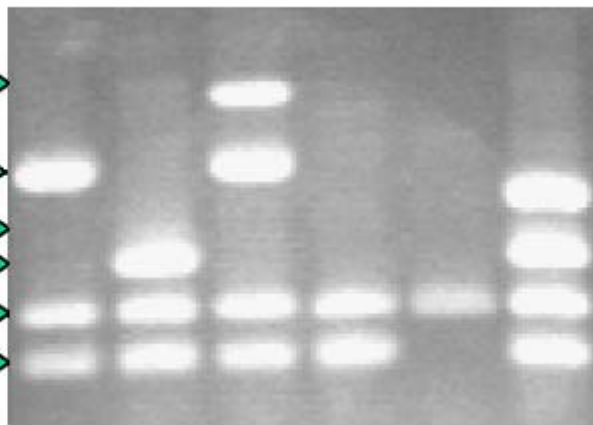
Comparazione tra i 3 protocolli disponibili

Doumith *et al.* (2004)



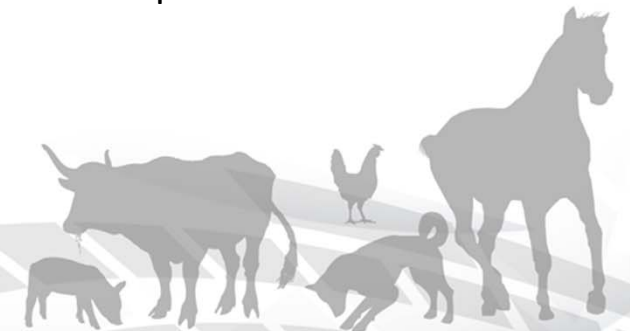
IIa IIb IIc IVb *Listeria* spp.

lmo1118 906 bp
lmo0737 691 bp
ORF2110 597 bp
ORF2819 471 bp
prs 370 bp
prjA 274 bp



IIa IIb IIc IVa *Listeria non monocytogenes* IVb

- Kerouanton *et al.* (2010)
- Aggiornamento protocollo EURL



Sierotipizzazione molecolare

Comparazione tra i 3 protocolli disponibili

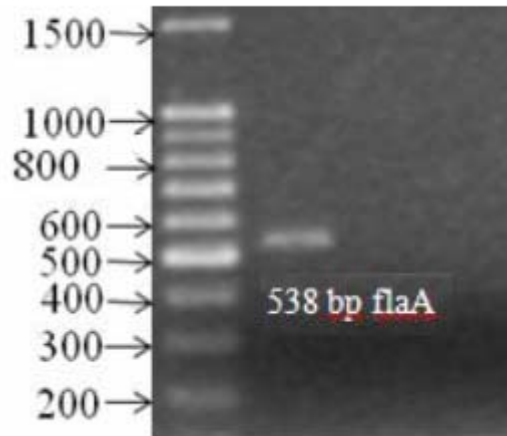
Protocollo	Sierogruppo Molecolare					
Doumith <i>et al.</i> (2004)	IIa (Sierotipo 1/2a and 3a)	IIb (Sierotipo 1/2b, 3b and 7)	IIc (Sierotipo 1/2c and 3c)	IVb (Sierotipo 4d , 4e)		
Kerouanton <i>et al.</i> (2010)	IIa (Sierotipo 1/2a and 3a)	IIb (Sierotipo 1/2b, 3b e 7)	IIc (Sierotipo 1/2c e 3c)	IVb (Sierotipo 4b, 4d, 4e e 4ab)	IVa (Sierotipi rari 4a, 4c)	<i>Listeria (non monocytogenes)</i>
Aggiornamento protocollo EURL						



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Sierotipizzazione molecolare

Aggiornamento dell' EURL Lm



L'EURLm ha sequenziato il gene *flaA* di ceppi di riferimento e di ceppi di campo, identificati sierologicamente come 1/2c e 1/2a.

I risultati hanno dimostrato che non vi era alcuna specifica regione nei ceppi del sierotipo 1/2a o nei ceppi del sierotipo 1/2c

La PCR del gene *flaA* diviene una PCR complementare al fine di fornire ulteriori informazioni sulla concordanza tra sierotipo convenzionale e sierotipo molecolare

I risultati della PCR per il gene *flaA* potranno essere aggiunti a quelli del sierogruppo. Es. Ilc *flaA*⁺; IIa *flaA*⁻





Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento

PFGE

Comparazione del protocollo PFGE EURL Lm e PulseNet International

1998: Standardized Molecular Subtyping of Foodborne bacterial pathogens by PFGE, CDC

Implementation in EURL lab

2001: PulseNet USA SOP, CDC

Optimization

2009: Revisited PulseNet USA SOP, CDC

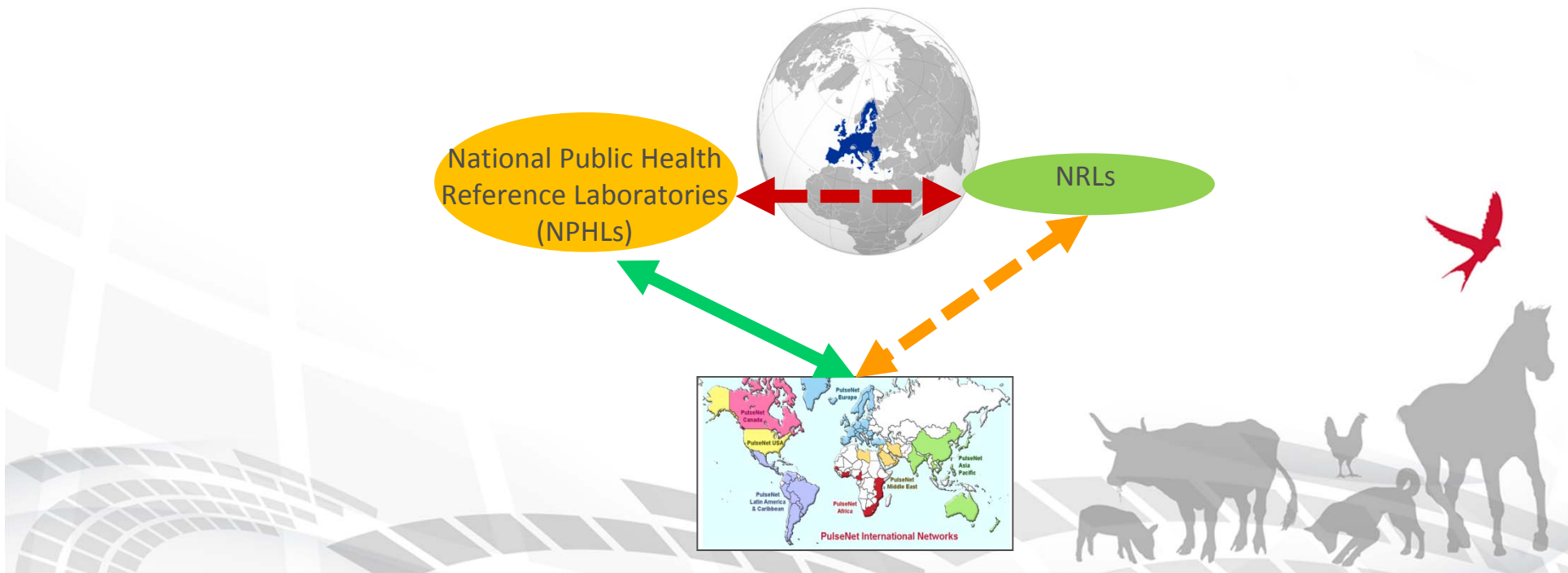
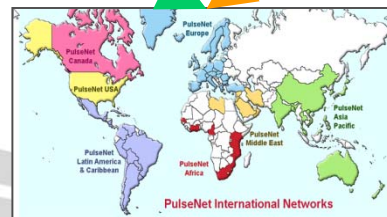
2009: EURL PFGE SOP

2013: PulseNet International SOP

Minor differences

National Public Health Reference Laboratories (NPHLs)

NRLs





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

PFGE

Obiettivo Comparazione

➤ Comparazione tecnica:

➤ **al fine di identificare vantaggi / svantaggi e punti critici di ciascun protocollo**

➤ Comparazione dei risultati di sub-tipizzazione tra i due protocolli

➤ **Per verificare se le procedure generano risultati paragonabili (profili indistinguibili)**

➤ **Per dare la possibilità di scegliere**

➤ **Per aggiornare il protocollo EURL PFGE**

➤ Selezione di un pannello di 114 ceppi (origine, sierogruppo molecolare, ceppi dei PT trials)

➤ Tipizzati con entrambi i protocolli

➤ 70 dei quali erano in precedenza tipizzati con il protocollo 2009 PN USA SOP dal SSI (progetto di collaborazione)



Protocollo EURL

18-48h in TSA-ye o ALOA
1.6-1.8 OD₆₀₀

 Laboratorio Nazionale di Riferimento

2 mg/ml
37°C per 10 min.
1.2%
0.1 mg/ml
Blocchetti stretti

0.15 mg/ml
37°C/50°C

Richiesto (BSA incluso)
100 µl
5/10
37°C per 4h / 37°C per 4h

6-12
1
3-5

6.25
5.76

50-70

Preparazione sospensione batterica

Tempo di incubazione
Concentrazione batterica

Preparazione blocchetti

[Lisozima]
Condizione di incubazione Lisozima
[Agarosio]
[Proteinase K]
Tipologia di supporto raccomandato

Lisi cellulare

[Proteinase K]
Temperatura di lisi/lavaggi

Digestione enzimatica

Pre-restrizione
Volume di restrizione
Ascl/Apal (Unità/campione)
Condizioni di incubazione (Ascl/Apal)

Caricamento

Numero di ceppi tipizzati (Ascl/Apal) per gel
(Piccolo – Grande)
Controllo di estrazione
Riferimenti per gel

Costo (€) (per ceppo tipizzato)

Gel piccolo
Gel grande

Time (h)

Protocollo PulseNet USA

14-18h in BHI Agar
1.0 OD₆₁₀

0.95 mg/ml
55-60°C per 10-20 min.
1%
0.48 mg/ml
Blocchetti larghi

0.10 mg/ml
54-55°C

Fortemente raccomandato
200 µl
25/25
37°C per 2h / 25-30°C per 2h

3.5-5.5
Non richiesto
3-4

23.30
20.93

44-45



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

PFGE

Comparazione del protocollo PFGE EURL Lm e PulseNet International

• Vantaggi/svantaggi:

■ Protocollo EURL

- ⇒ Utilizzo del controllo di estrazione
- ⇒ Alta produttività
- ⇒ Adattato a variazioni del flusso di lavoro
- ⇒ Ottimizzazione dei costi (3-4 volte meno costoso)
- ⇒ Qualità dei profili equivalente a quello del protocollo PulseNet

■ Protocollo PulseNet

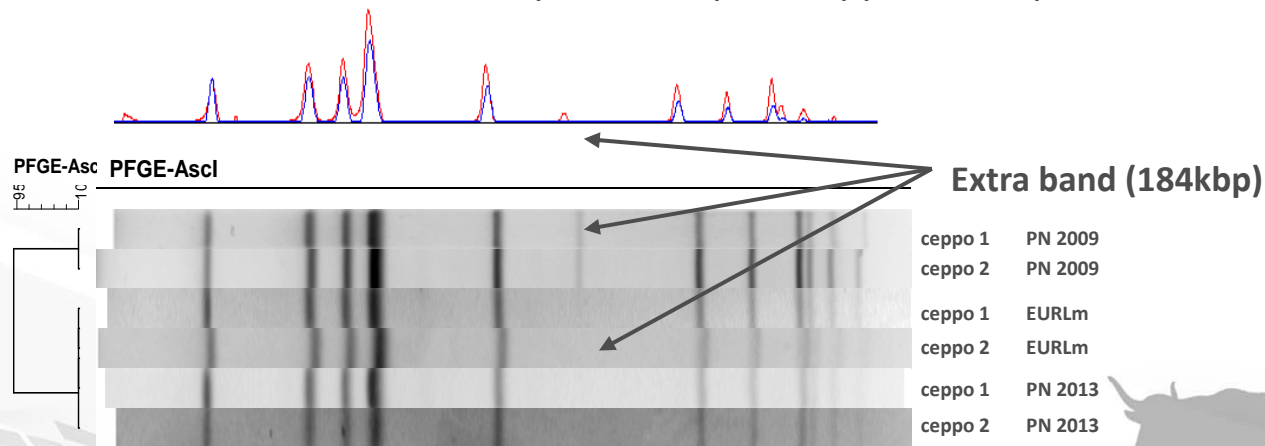
- ⇒ Spot, sfocatura e danni facilmente evitabili con utilizzo dei blocchetti larghi per cui il segnale rimane analizzabile
- ⇒ 6 ore più breve in condizioni ottimali (coltura batterica: 4h, restrizione: 2h)
- ⇒ Fase di estrazione: digestione con il lisozima a 56° C può risultare un punto critico.



Comparazione del protocollo PFGE EURLm e PulseNet International

Risultati di PFGE confrontabili tra i protocolli (>98%)

- ⇒ Solo un ceppo (analizzato in duplicato) presenta due profili diversi (95% similarità) per l'enzima AscI
 - ⇒ Una banda extra con il protocollo PulseNet (USA del 2009)
 - ⇒ Inspiegabile differenza (In PT trial 2009-10 (1%), 2012 (0.6%))
 - ⇒ A volte riscontrata da altri laboratori di riferimento
 - ⇒ Assente con il recente protocollo (PulseNet 2013)
- ⇒ La riproducibilità dei risultati in PFGE è soddisfacente (Duplicati)
- ⇒ Relazione epidemiologica tra i ceppi viene rilevata dal confronto incrociato dei profili PFGE prodotta da diversi protocolli PFGE.
- ⇒ Performance di PFGE equivalente per i ceppi "non tipizzabili"





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

PFGE

Comparazione del protocollo PFGE EURL Lm e PulseNet International

Conclusione

- **Comparazione tecnica**

- **Differenze tra i tre protocolli.**

- ⇒ EURL Lm / PulseNet

- ↪ Temperature e tempi di incubazione (alcune differenze)
- ↪ Concentrazione dei reagenti (enzima)
- ↪ Attrezzatura (stampi per i blocchetti e i pettini)

- **Confronto dei risultati**

- **I tre protocolli forniscono profili di PFGE comparabili**

- ⇒ **Condivisione dei profili di PFGE provenienti da diversi protocolli è possibile**

- ↪ Indagini Epidemiologiche (EURL Lm DB)
- ↪ Baseline Survey-ELiTE
- ↪ EFSSA-MTDC (Molecular Typing Data Collection)
- ↪ Altri PulseNet Networks





GRAZIE