



IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO



*Listeria monocytogenes*

Laboratorio Nazionale di Riferimento

## Aggiornamenti dal Workshop annuale del Laboratorio Europeo di Riferimento

Luigi Iannetti

Giornate di studio «I LNR per *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes*»

15 e 16 dicembre 2015 - Teramo





# Il workshop EURL Lm 2015

 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Maisons-Alfort (Francia), 25-27 marzo 2015

## Principali argomenti trattati:

- Epidemiologia di *Listeria monocytogenes*: report da EFSA e ECDC; recenti focolai in Paesi Membri
- Caratterizzazione molecolare e sorveglianza epidemiologica
- Aggiornamenti sulle tecniche di laboratorio convenzionali per la ricerca e la numerazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti
- Studi di shelf-life: nuove linee guida e metodi di contaminazione



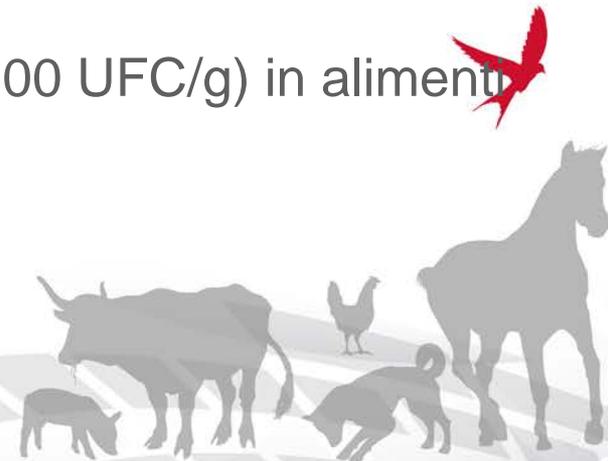


 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

# Epidemiologia di *Listeria monocytogenes*

## Report EFSA/ECDC 2015 sulle zoonosi e presentazione ECDC su casi di listeriosi invasiva

- Preoccupazione per l'aumento dei casi di listeriosi invasiva a livello europeo (aumento dell'8,6% del numero di casi 2013 rispetto al 2012) nonostante che:
  - Le frequenze di contaminazione nei diversi alimenti RTE sono restate simili agli anni precedenti
  - Scarsa frequenza di alte concentrazioni ( $> 100$  UFC/g) in alimenti RTE





 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

# Epidemiologia di *Listeria monocytogenes*

12 principali focolai di tossinfezione da *Listeria monocytogenes* in UE nel 2013 segnalati nel report EFSA/ECDC, causati da:

- Prodotti della pesca RTE, crostacei (carne di granchio)
- Formaggi
- Carni e prodotti a base di carne
- Vegetali e prodotti derivati (insalata RTE)

Nell'ambito del workshop, **Danimarca** e **Svezia** hanno dettagliato le caratteristiche di **focolai di listeriosi** verificatisi recentemente (2013-2014) nei loro territori:

- dovuti a **prodotti a base di carne suina** («rullepolser» e «medwurst»)
- **contaminati dall'ambiente degli stabilimenti di produzione**
- coinvolti soprattutto **soggetti anziani** (> 65 anni)





# Caratterizzazione molecolare

 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Sono state presentate le principali attività EURL per il 2015/2016 e i risultati delle attività 2014 relative alle tecniche di caratterizzazione molecolare

- PT Trial EURL su PFGE e sierotipizzazione (risultati positivi)
- Corsi di formazione EURL su PFGE
- Organizzazione e gestione del database EURL dei profili PFGE e sua confluenza nel nuovo database EFSA che, a sua volta, alimenterà il database comune EFSA/ECDC
- Update sulle risultanze del progetto Elite (European Listeria Typing Exercise )





 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

## Database EFSA

Il database sperimentale EURL dei profili PFGE di Lm, cui ha partecipato negli ultimi 3 anni anche il LNR italiano insieme ad altri 8 Stati Membri, viene trasferito nel nuovo database EFSA per la raccolta di dati su ceppi di origine alimentare di:

- Salmonella, VTEC and *Listeria monocytogenes*
- Inizialmente solo profili PFGE e, solo per Salmonella, MLVA
- Successivamente estensione alle nuove tecniche di WGS

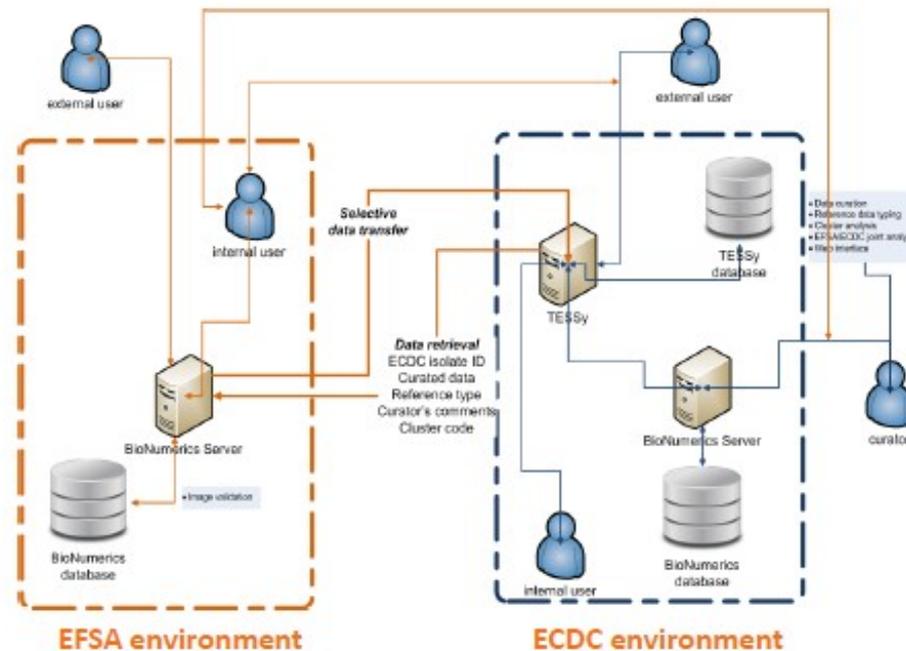
La gestione dei profili PFGE di *Listeria monocytogenes* resterà a carico dell'EURL, nell'ambito del database EFSA



# Caratterizzazione molecolare

## Database comune EFSA/ECDC

Il nuovo database EFSA alimenterà, a sua volta, il nuovo database comune EFSA/ECDC, comprendente anche informazioni su ceppi da casi clinici umani



Solo una piccola parte dei dati EFSA sarà passata nel database comune, al fine di garantire la riservatezza dei dati





# Caratterizzazione molecolare

 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

L'Italia, attraverso il LNR, continuerà ad alimentare il database Listeria gestito da EURL-EFSA, comprendente profili PFGE da utilizzare ai fini della sorveglianza molecolare a livello europeo, anche nell'ambito del nuovo database comune EFSA/ECDC

**I documenti EFSA relativi alla creazione al nuovo database sono disponibili ai link:**

<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/712e.htm>

<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/702e.htm>

Il nuovo database EFSA è attualmente in fase sperimentale pilota, che dovrebbe concludersi nel 2016.



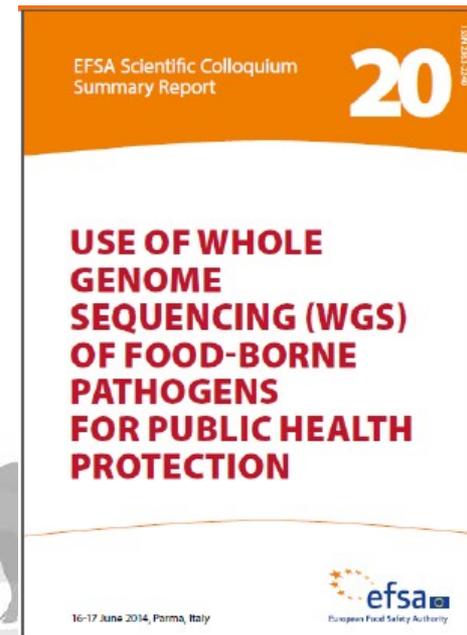
# Caratterizzazione molecolare

## Applicazione del WGS per la sorveglianza epidemiologica

Nel corso del workshop l'applicazione del WGS per la sorveglianza epidemiologica di *Listeria monocytogenes* è stata ripetutamente indicata come il futuro prossimo

E' stato segnalato un documento EFSA di riferimento pubblicato nel 2015:

<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/743e.htm>



# Caratterizzazione molecolare

## Applicazione del WGS per la sorveglianza epidemiologica

E' stato dato ampio spazio alle esperienze danesi (DTU e Statens Serum Institut) in questo campo, comprendenti anche il confronto dei ceppi umani e di origine alimentare nell'ambito di focolai epidemici



- Typing of human isolates
- Patient interviews



- Control food producing companies
- Take samples and isolate *Listeria*



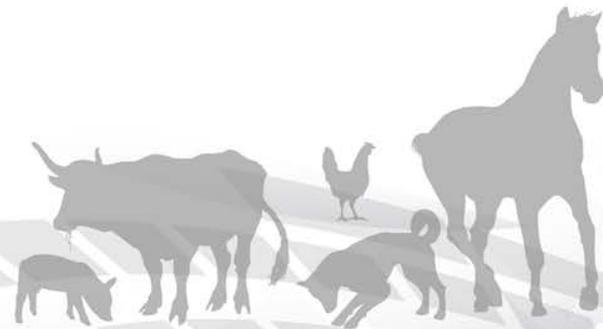
- Typing of food and veterinary isolates



# Caratterizzazione molecolare

## Progetto ELiTE (European Listeria Typing Exercise)

- Sono state fornite le risultanze parziali del progetto ELiTE, in corso dal 2013, gestito dall'ECDC e a cui hanno partecipato per l'Italia il LNR (area «alimenti») e l'ISS (area «umana»)
- L'ultimo gruppo di lavoro si è riunito a febbraio 2015, la parte tecnica è conclusa, sono stati confrontati i profili PFGE da ceppi alimentari e ceppi umani raccolti in diversi paesi europei
- I profili, pur prodotti da laboratori diversi, sono risultati confrontabili secondo l'EURL e il SSI (Statens Serum Institut - DK)
- Un report finale dovrebbe essere pubblicato a breve (fine 2015-inizio 2016)



# Tecniche di laboratorio convenzionali

## Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

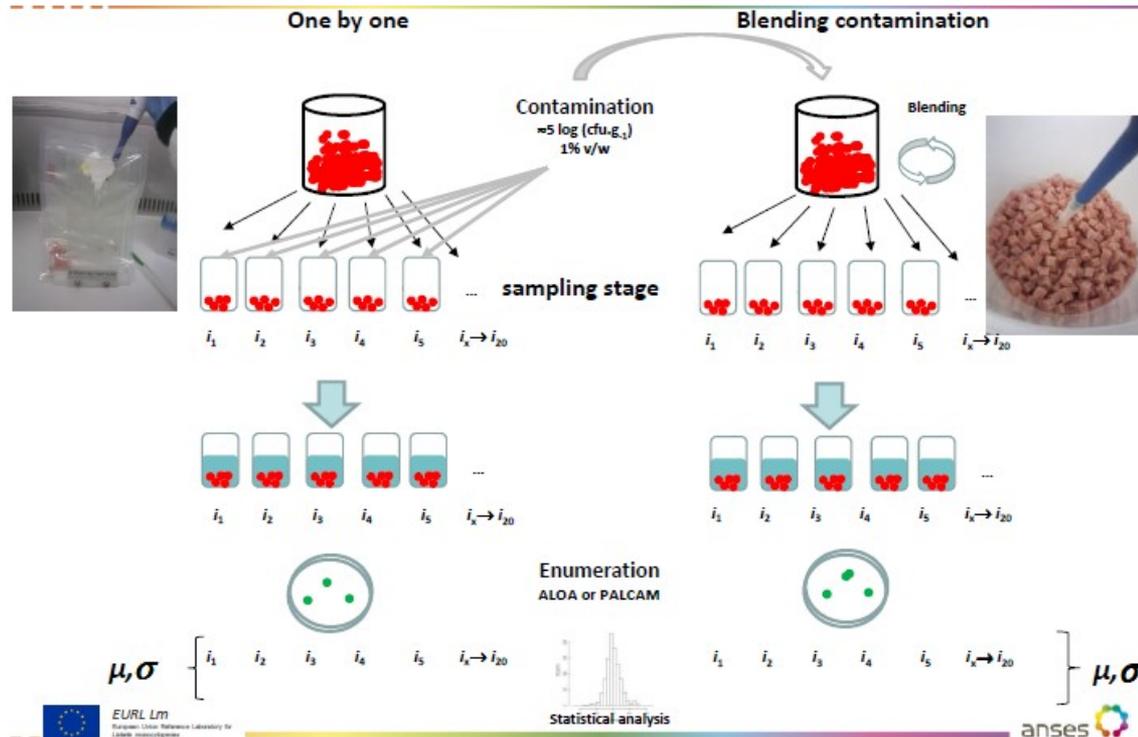
- Stato della revisione della EN ISO 11290-1&2: la bozza è in via di revisione e potrebbe essere approvata dalla CEN/ISO all'inizio del 2016 (gruppo di lavoro CEN/TC275/WG6 TAG17)
- Update sui PT trial ai quali hanno partecipato gli LNR (2014, isolamento in insalata iceberg): risultati molto positivi
- Stesura delle linee guida EURL sulle modalità di outsourcing della gestione dei PT trial organizzati dagli LNR a livello nazionale: un working group, di cui fa parte anche il nostro LNR, ha cominciato a lavorare a queste linee guida nel corso del 2015



# Tecniche di laboratorio convenzionali

## Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

- Confronto di diverse tecniche di inoculo utilizzate per circuiti interlaboratorio (contaminazione “one-by-one” delle singole unità da sottoporre ad analisi e contaminazione “blending” prima della suddivisione in unità)



Report risultati  
in via di  
pubblicazione



# Tecniche di laboratorio convenzionali

## Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

- La tecnica “blending” è risultata più soddisfacente:
  - meno laboriosa
  - maggiore omogeneità di contaminazione
  - più preciso raggiungimento del livello target di contaminazione
- La tecnica “one-by-one” preserva meglio la struttura della matrice
- Il report dei risultati del test è in via di pubblicazione



# Tecniche di laboratorio convenzionali

## Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

- Incertezza di misura: impatto della quantità di campione analizzata per la numerazione
- Uno studio EURL effettuato nel 2014 ha dimostrato che 100 g sono preferibili agli attuali 10g previsti dalla ISO, in quanto riducono in maniera significativa gli effetti dell'eterogeneità della contaminazione nel campione
- 100g: troppi secondo molti LNR
- Un nuovo studio è stato lanciato nel 2015 per verificare se anche 25g offrono un evidente vantaggio
- Il nostro NRL sta partecipando a questo studio



## Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

- Studio EURL sull'impatto del "wet pooling" (analisi di campioni in pool dopo l'arricchimento primario), effettuato secondo la bozza ISO/DIS 6887-1 (preparazione dei campioni per il laboratorio), sulla ricerca di Lm negli alimenti
- E' stata rilevata una perdita di sensibilità del 10%. L'EURL trasmetterà questo risultato al TAG 17 del CEN/TC 275/WG 6 (che sta revisionando le ISO 11290), che potrebbe aggiungere una nota nella nuova versione della EN ISO 11290-1.
- Il "dry pooling" (direttamente da campioni di alimento) non è stato valutato ma si suppone possa avere un effetto ancora peggiore sulla sensibilità del metodo. L'EURL effettuerà un altro studio a tal proposito





# Tecniche di laboratorio convenzionali

 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

## Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

- Applicabilità del EN ISO 11290-1&2 (ricerca e numerazione) in presenza di nuove specie di *Listeria*: nuovo progetto EURL
- *L. cornellensis*, *L. grandensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* sono spesso risultate difficilmente rilevabili dopo il primo e secondo arricchimento
- Non si sono verificati falsi positivi per *Listeria monocytogenes* su agar selettivo
- Solo risultati preliminari, i risultati definitivi saranno pubblicati a fine 2015





# Studi di shelf-life

 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

## Nuove linee guida e metodi di contaminazione

- Presentazione delle nuove linee guida per l'esecuzione di studi di shelf-life (V3-06/06/2014)
- Presentazione di un nuovo metodo di contaminazione usando un aerografo («airbrush»)
- Introduzione del nuovo gruppo di lavoro (partecipa anche il nostro LNR) per la revisione delle linee guida EURL per la valutazione della competenza dei laboratori che eseguono challenge test (V0 – 03/02/2012)
- Presentazione del sistema gestito dall' LNR francese per la «certificazione» dei laboratori che effettuano studi di shelf-life in Francia
- Introduzione dello studio EURL, basato sui dati raccolti nel baseline 2011-2012, sulle temperature di refrigerazione alla vendita di prodotti RTE



# Studi di shelf-life

## Tecnica di contaminazione con «airbrush»

- Prodotta una linea guida con risultati preliminari (V1-29/01/2015)
- Permette omogenea contaminazione di superfici solide

### Description of the airbrush kit, model A430 (Aztek)



Airbrush



Nozzles (a gray: 40mm, a turquoise: 50mm and a red: 53mm)



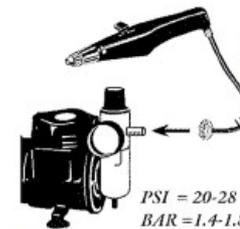
Nozzle wrench



Gravity feed cup



Siphon caps



Air compressor

Compressor  
adapter





 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

# Presentazioni workshop 2015



Tutte le slide delle presentazioni del workshop EURL Lm 2015 sono disponibili sul sito del LNR al link

<http://www.izs.it/IZS/Engine/RAServePG.php/P/762810010700/M/762910010720/T/workshop-EURL-Lm-2015>





**Grazie per l'attenzione!**