



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



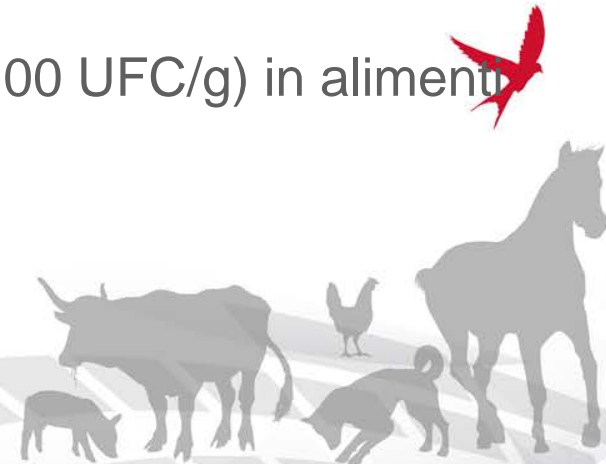


 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

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)





Caratterizzazione molecolare

 *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

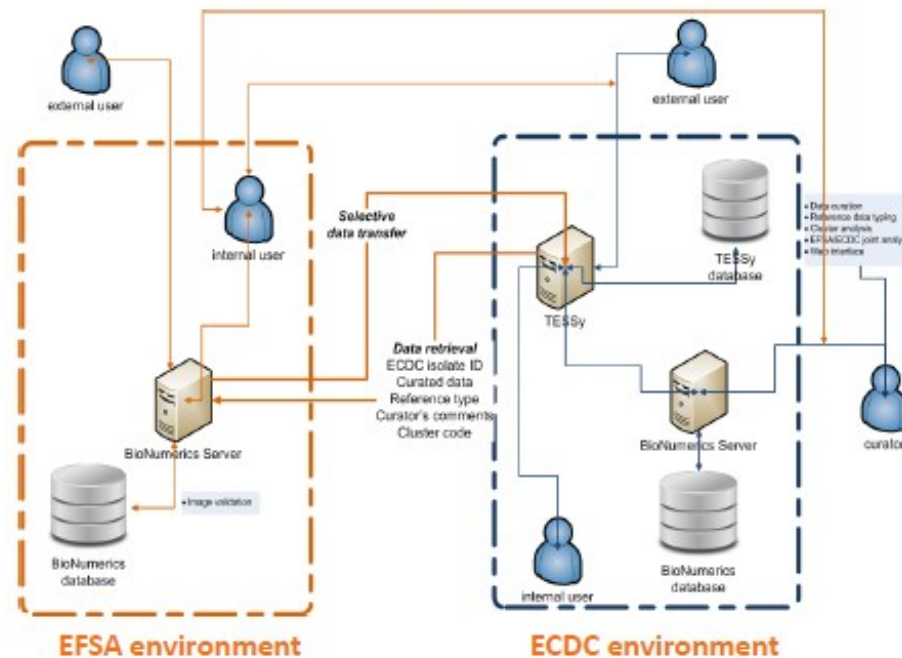
La gestione dei profili PFGE di *Listeria monocytogenes* resterà a carico dell'EURL, nell'ambito del database EFSA



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.



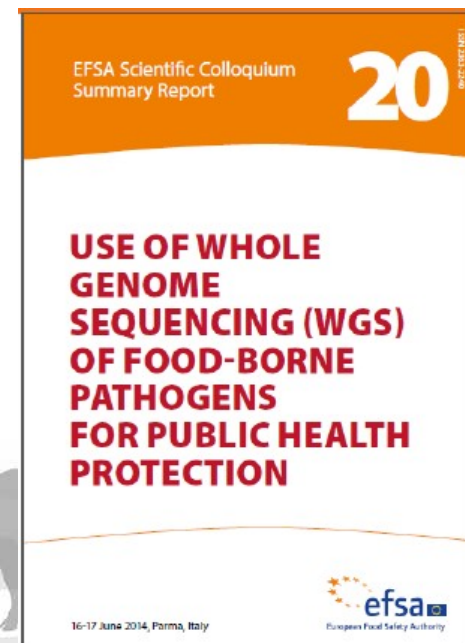
Caratterizzazione molecolare

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*



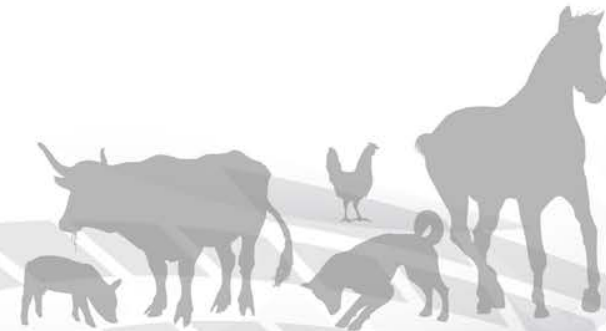
- Typing of food and veterinary isolates



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

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Aggiornamenti sulle tecniche di isolamento e numerazione

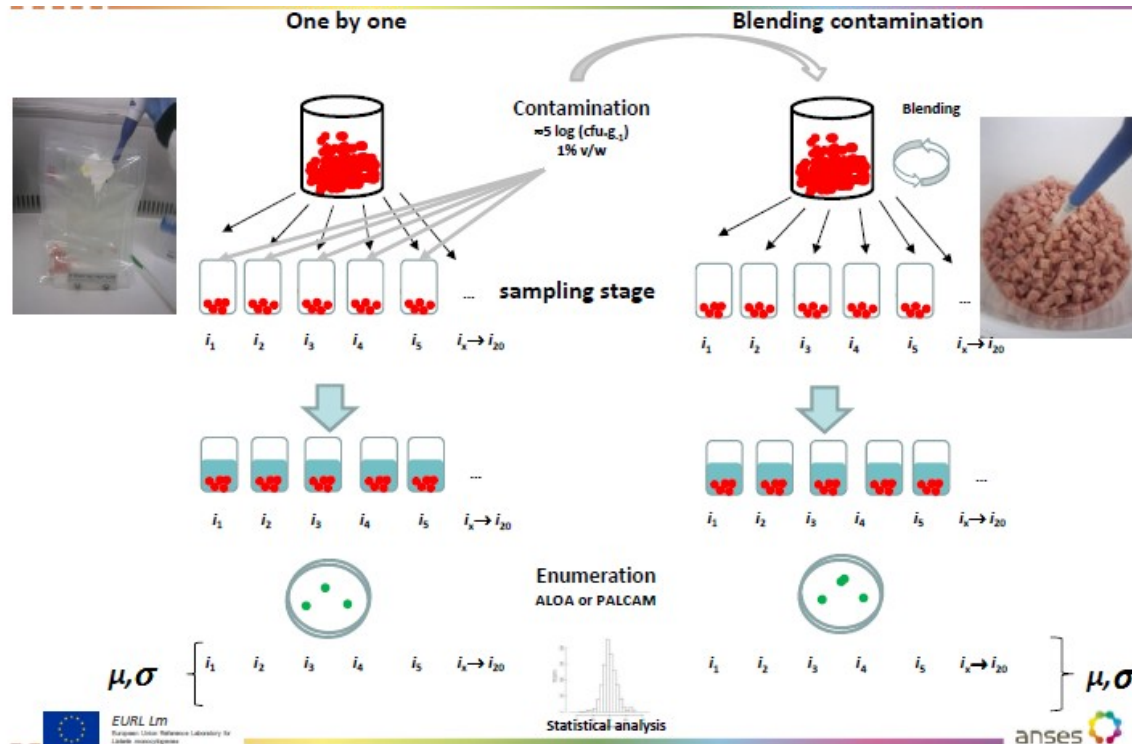
- Stato della revisione della EN ISO 11290-1&2: la bozza è in via di revisione e potrebbe essere approvata dalla CEN/ISO all'inizio del 2016 (gruppo di lavoro CEN/TC275/WG6 TAG17)
- Update sui PT trial ai quali hanno partecipato gli LNR (2014, isolamento in insalata iceberg): risultati molto positivi
- 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

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)



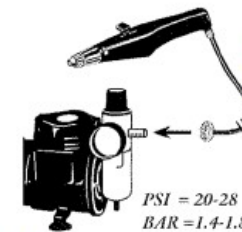
Nozzle wrench



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!