



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Caratterizzazione di ceppi di *Listeria monocytogenes*: quanti per un campione positivo?

Vicdalia Acciari, Anna Ruolo, Francesco Pomilio

Giornata di studio su "Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la *Listeria monocytogenes*". Teramo 14 dicembre 2017



Premesse

- a) Sono stati pubblicati vari lavori scientifici relativi alla presenza di più di un ceppo di *L. monocytogenes* nello stesso campione, sia esso campione di alimento che di altro tipo
- b) La scoperta della presenza di ceppi appartenenti a più pulsotipi in un solo campione potrebbe essere spiegata con la contaminazione di più siti in una industria alimentare (von Laer et al. (2009))



c) Da un punto di vista epidemiologico, la presenza di cloni differenti di *L. monocytogenes* nello stesso campione enfatizza il bisogno di tipizzare più ceppi isolati dallo stesso campione.

Ana Eucares von Laer, Andréia Saldanha de Lima, Paula dos Santos Trindade, Cristiano Andriguetto, Maria Teresa Destro, Wladimir Padilha da Silva (2009). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in pelotas-rs by PFGE; *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 574-582

In più studi clinici è stato dimostrato che isolati di un solo paziente appartenevano a cloni diversi di *L. monocytogenes*.

Ciò può avere rilevanza?

- Forse no dal punto di vista clinico
- Ma può confondere gli epidemiologi che tentano di trovare connessioni tra casi clinici e sorgente dell'infezione.

WilhemTham, Gloria Lopez-Valladares, SevedHelmersson, Stefan Wennström, Anders O" sterlund, and Marie-Louise Danielsson-Tham (2013). Occurrence of Genetic Variants of *Listeria monocytogenes* Strains, *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* Volume 10, Number 9, p. 825-826 Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/fpd.2012.1456

- a) In un paziente con listeriosi, gli isolati appartenevano a più di una variante genetica di *L. monocytogenes*.
- b) In un campione di liquido sinoviale di un paziente, erano presenti tre diversi ceppi di *L. monocytogenes*. Questo si è verificato anche in un altro paziente.
- c) In focolai, casi sporadici ed eventi simili, la presenza di più ceppi di *L. monocytogenes* in un singolo campione potrebbe essere più comune di quanto si pensi.

Wilhem Tham, Gloria Lopez-Valladares, Seved Helmersson, Stefan Wennström, Anders Osterlund, and Marie-Louise Danielsson-Tham (2013). Occurrence of Genetic Variants of *Listeria monocytogenes* Strains, *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* Volume 10, Number 9, p. 825-826 Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/fpd.2012.1456

In altri studi ricercatori hanno trovato da due a quattro cloni di *L. monocytogenes* in campioni di formaggio

Anche questo rilievo enfatizza la necessità di tipizzare più di un ceppo da ciascun campione di alimento positivo.

Danielsson-Tham ML, Bille J, Brosch R, Buchrieser C, Persson K, Rocourt J, Schwarzkopf A, Tham W, Ursing J. (1993) Characterization of *Listeria* strains isolated from soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*. Apr;18(2):161-166.

- a) La presenza di più ceppi in un focolaio negli USA è stata riscontrata nel 2011, causato dalla contaminazione dei meloni
- b) Laksanalamai et al. (2012) hanno individuato quattro pulsotipi combinati (PFGE) isolati da pazienti, ambiente e frutta

Pongpan Laksanalamai, Lavin A. Joseph, Benjamin J. Silk, Laurel S. Burall, Cheryl L. Tarr, Peter Gerner-Smidt, Atin R. Datta. (2012). Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in a Multistate Listeriosis Outbreak Associated with Cantaloupe in US. PLoS One; 7(7): e42448. Published online 2012 Jul 31. doi: 10.1371/journal.pone.0042448

Scopo dello studio

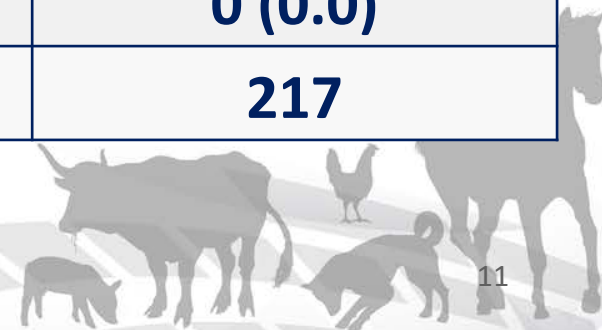
- Lo scopo della presentazione è di esporre i risultati ottenuti con valutazioni statistiche effettuate nel LNR Lm sui ceppi depositati,
- È stata valutata statisticamente la presenza di più di un ceppo di *L. monocytogenes* nello stesso campione
- Sia esso alimento sia di campioni ambientali
- La diversità è stata valutata utilizzando i risultati delle prove di PFGE e sierotipizzazione.

Materiali e metodi

- a) Un totale di 1293 ceppi di *L. monocytogenes* (1076 da 325 campioni alimentari e 217 da 43 campioni ambientali) sono stati raccolti tra il 2011-2015 presso il "NRL per *L.m.*".
- b) I ceppi sono stati caratterizzati con sierotipizzazione convenzionale e PFGE.
- c) Ogni ceppo proveniente dallo stesso campione è stato identificato con lo stesso NRG.

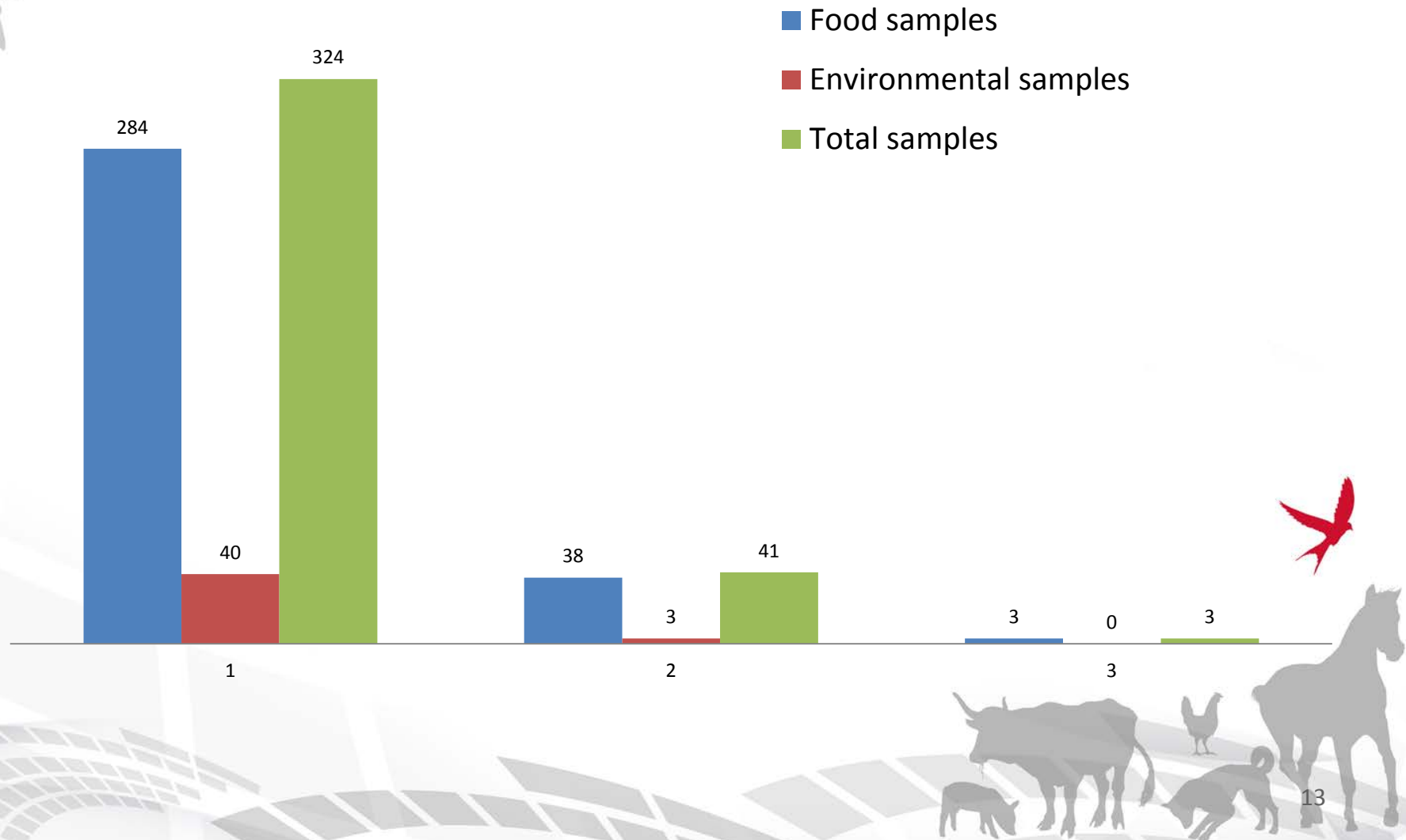
N° di ceppi isolati per campione	N° di campioni ambientali	N° di campioni di alimenti
2	4	67
3	13	195
4	3	21
5	13	33
6	1	1
7	1	1
8	-	1
9	-	2
10	8	-
11-23	-	4
Total	43	325

Sierotipo	Numero di ceppi raccolti (%)	Numero di ceppi isolati da alimenti (%)	Numero di ceppi isolati da campioni ambientali
1/2a	797 (61.6)	633 (58.8)	164 (75.6)
1/2b	187 (14.5)	149 (13.8)	38 (17.5)
1/2c	180 (13.9)	177 (16.4)	3 (1.4)
4b	78 (6)	67 (6.2)	11 (5.1)
3a	39 (3)	39 (3.6)	0 (0.0)
4d	9 (0.7)	8 (0.7)	1 (0.5)
3b	3 (0.2)	3 (0.3)	0 (0.0)
Totali	1293	1076	217



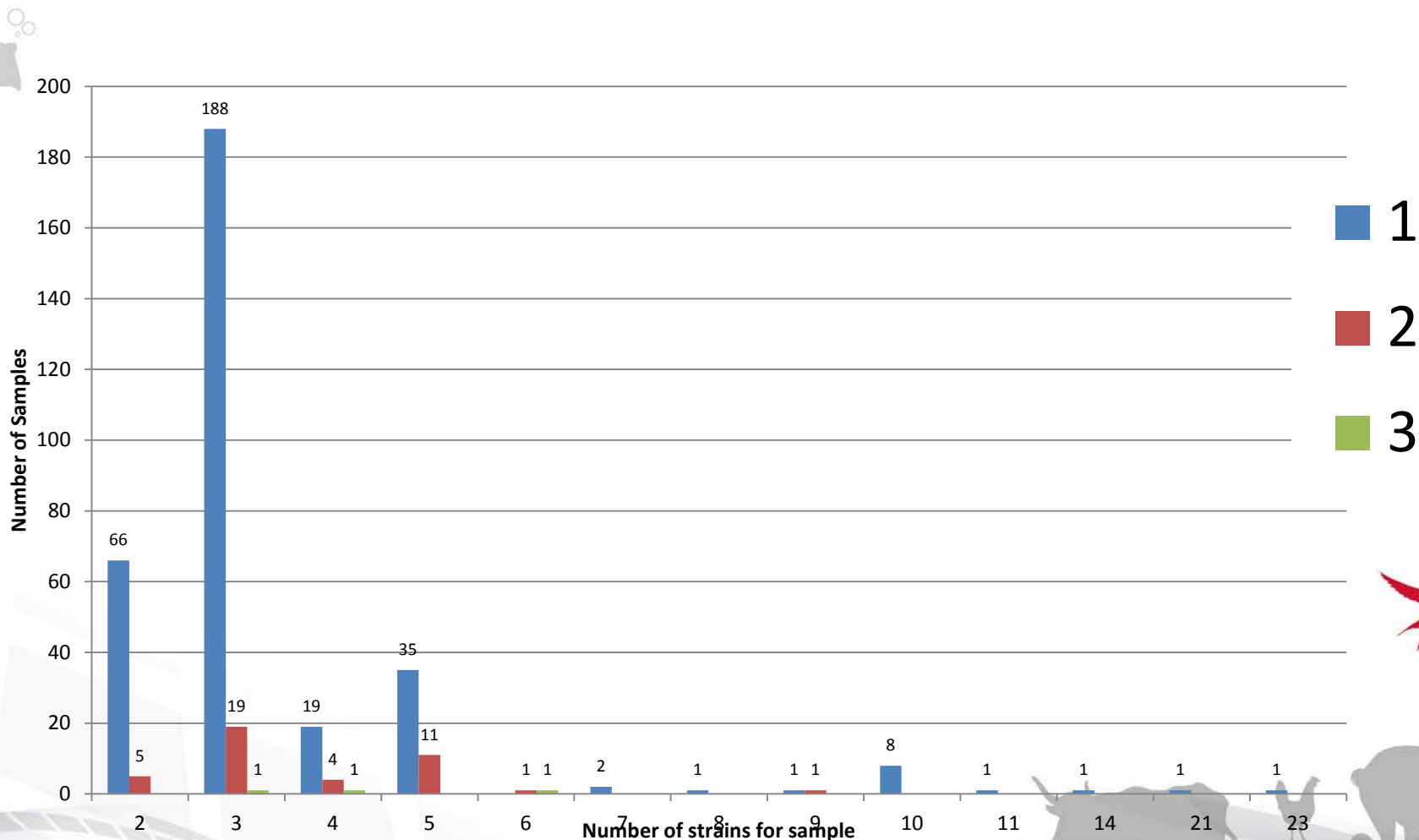
Numero di sierotipi	N° di campioni di alimenti (%)	N° di campioni ambientali	Numero totale di campioni (%)
1	284 (87.4)	40 (93)	324 (88.1)
2	38 (11.7)	3 (7)	41 (11.1)
3	3 (0.9)	0	3(0.8)
Totale	325	43	368

Numero di sierotipi per campione



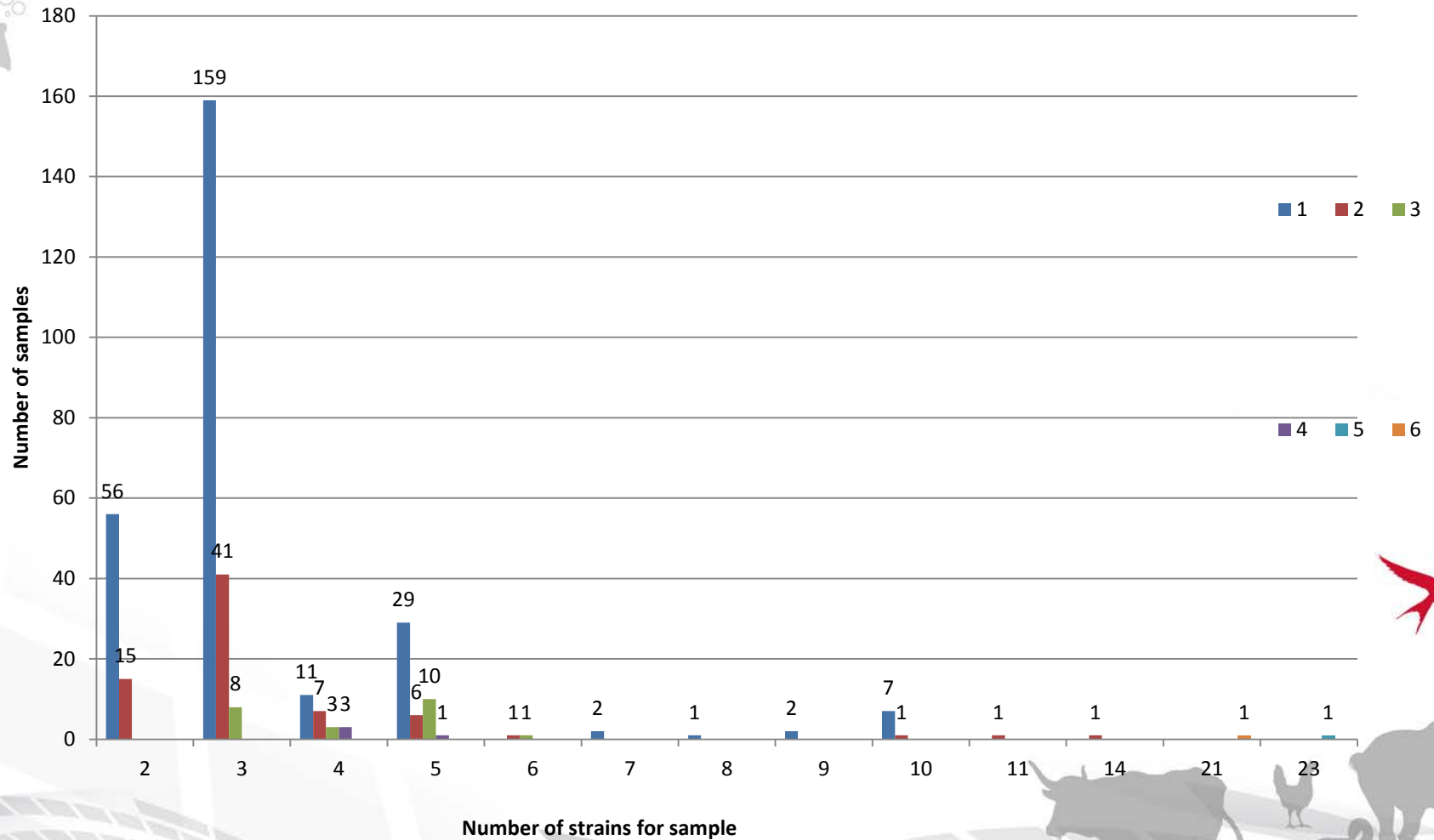
Risultati

Numero di campioni e numero di ceppi per campione



Numero di pulsotipi per campione

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Origine	Campioni esaminati	Campioni con più di un pulso tipo (%)	L.C. 95%
Pesce	97	14 (14,4%)	8,8 - 22,8%
Carne	127	38 (29,9%)	22,6- 38,4%
Latte formaggi	120	42 (35,0%)	27,0- 43,9%
Alimenti compositi	11	7 (63,6%)	34,9- 84,8%



- a) I ceppi caratterizzati dal LNR Lm isolati da un solo campione hanno evidenziato variabilità genetica, dimostrata mediante sierotipizzazione e PFGE.
- b) La PFGE è stata in grado di rilevare una maggiore variabilità (166 pulsotipi) rispetto alla sierotipizzazione (7 sierotipi).
- c) I sierotipi più comuni sono 1/2a sia negli alimenti (61,6%) sia nei campioni ambientali (58,8%)

- d) L'89,16% dei pulsotipi sono origine/specifici (alimentare o ambientale).
- e) Il numero di pulsotipi trovati in latte e prodotti lattiero caseari è statisticamente significativo e più alto rispetto ai prodotti ittici.

Limiti dello studio

- a) Non sono state considerate le differenze tra campioni ambientali e alimenti in quanto i campioni ambientali considerati sono pochi.
- b) I laboratori non inviano sempre lo stesso numero di ceppi quindi stimare le probabilità di perdere pulsotipi non può essere calcolata in modo puntuale.



 *Listeria monocytogenes*

- a) In un singolo campione potrebbero essere presenti più ceppi di *L. monocytogenes* e l'ingestione contemporanea di più di un ceppo da parte di un solo consumatore è probabile.
- b) Aumentando il numero di ceppi analizzati è maggiore la probabilità di trovare più pulsotipi e quindi di rappresentare meglio la popolazione che è presente nel campione.
- c) Quindi bisogna inviare più di un ceppo.

- d) Durante le indagini in corso di epidemie di listeriosi la mancanza di isolamento e caratterizzazione di più ceppi può comportare il mancato isolamento del ceppo isolato nell'uomo e quindi contribuisce al disallineamento tra isolati clinici e fonti di infezione durante le indagini in corso di epidemie di listeriosi
- e) Più ceppi sono esaminati e maggiore è la probabilità di individuare ceppi responsabili dell'epidemia.
- f) Nel caso in cui c'è un campionamento ambientale con un numero elevato di ceppi da esaminare questa situazione potrebbe correggere la debolezza della caratterizzazione di un solo ceppo.

- g) Il laboratorio dovrebbe inviare almeno tre isolati per rilevare più di un pulsotipo o meglio inviare cinque isolati per rilevare almeno due pulsotipi.
- h) Gli studi già pubblicati evidenziano l'importanza di utilizzare più di un mezzo di arricchimento primario e di raccogliere un numero sufficiente di colonie per il campione quando si tenta di isolare specifici ceppi di *L. monocytogenes* durante le indagini sulla listeriosi di origine alimentare.

Elliot t. Ryser, Samuel M. Arimi, M. Marie-Claire Bunduki and Catherine W. Donnelly (1996) Recovery of Different Listeria Ribotypes from Naturally Contaminated, Raw Refrigerated Meat and Poultry Products with Two Primary Enrichment Media. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, N° 5 p. 1781–1787

- a) Studi precedenti hanno dimostrato che la presenza di più ceppi di *L. monocytogenes* in un singolo campione alimentare può complicare le indagini a valle e l'effettiva attribuzione della fonte non solo a causa della diversità genetica e fenotipica tra i ceppi, ma anche a causa delle loro interazioni, anzi alcuni ceppi presenti negli alimenti possono essere persi durante il rilevamento classico e tale probabilità dovrebbe essere presa in considerazione nelle indagini di epidemia.

Evangelia A. Zilelidou, Kathrin Rychli, Evanthia Manthou, Luminita Ciolacu, Martin Wagner, Panagiotis N. Skandamis (2015). Highly Invasive *Listeria monocytogenes* Strains Have Growth and Invasion Advantages in Strain Competition. PLoS ONE 10(11): 0141617. doi:10.1371/journal.

- b) La crescita di *L. monocytogenes* può essere inibita da ceppi della stessa specie, che causano potenzialmente il mancato recupero durante le procedure di arricchimento.
- c) Studi recenti hanno dimostrato tassi diversi di recupero dei ceppi di *L. monocytogenes* durante il processo di arricchimento selettivo, a seguito della competizione tra i ceppi
- d) La presenza di più di un ceppo di *L. monocytogenes* negli alimenti può portare ad un aumento dei tassi di infezione a causa di effetti sinergici sul potenziale di virulenza.

L'uso di NGS migliora la possibilità di identificare i ceppi di *L. monocytogenes* isolati da ciascun campione, in quanto è più agevole effettuare il sequenziamento di tanti ceppi.



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Grazie per l'attenzione

