

**PROGETTI DI RICERCA DA FINANZIARE**  
**CON RISORSE DEL FONDO SANITARIO NAZIONALE**

**Progetto presentato da:**

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna**

**- Struttura complessa Igiene degli Alimenti -**

**Laboratorio Microbiologia latte e derivati**

**Area tematica: SICUREZZA ALIMENTARE**

**Titolo del progetto:**

Ricerca, isolamento e caratterizzazione di Batteriofagi in ambienti di caseificio per il biocontrollo di *Listeria monocytogenes* nelle imprese alimentari

**Responsabile scientifico: Dr. Antonio Fadda**

Progetto elaborato da Dr. Giovanni Terrosu, Veterinario di Medicina specialistica del Laboratorio Microbiologia latte e derivati

**Titolo del progetto:** Ricerca, isolamento e caratterizzazione di Batteriofagi in ambienti di caseificio per il biocontrollo di *Listeria monocytogenes* nelle imprese alimentari

**Durata del progetto (espressa in mesi): 24 mesi**

**Area tematica: Sicurezza Alimentare**

**Responsabile scientifico del progetto:**

Cognome: Fadda

Nome: Antonio

Qualifica: Veterinario Dirigente

Telefono 079.2892341

Fax 079.2892324

E-mail: *antonio.fadda@izs-sardegna.it*

**ALLEGARE** - Curriculum vitae del responsabile scientifico.

Periodo di riferimento: ultimi 5 anni con indicazione anche delle 10 pubblicazioni scientifiche ritenute più significative, con particolare riferimento a quelle dell'area scientifica sulla quale insiste il progetto.

**Curriculum del responsabile scientifico del progetto: Dr. Fadda Antonio**

- Laurea in Medicina Veterinaria presso l'università di Parma nel 1986.
- Specializzazione in Microbiologia e virologia presso la Facoltà di Medicina dell'Università di Sassari nel 1998.
- Master in Gestione e direzione dei servizi Sanitari presso Medicare/Apsia nel 2012.
- 1990 Vincitore del pubblico concorso per Assistente Veterinario presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna.
- 1990 – 1994 Assistente Veterinario presso la Sezione Diagnostica di Sassari dell'IZS della Sardegna.
- 1994 – 1997 Assistente Veterinario presso il Laboratorio controllo latte e derivati.
- Dal 1998 – a tutt'oggi Dirigente responsabile del Laboratorio Microbiologia Latte e derivati
- Dal 1996 a tutt'oggi membro del Gruppo Nazionale UNI su "Analisi microbiologiche degli alimenti e delle bevande".
- Messa a punto ed esecuzione delle prove ufficiali per ricerche fisico-chimiche e microbiologiche sul latte e derivati, verifiche dell'autocontrollo aziendale, consulenza sul sistema HACCP delle aziende di trasformazione del latte, sia artigianali che industriali.
- Responsabile di numerosi progetti di ricerca corrente e finalizzata del Ministero della salute.
- Docente come Professore a contratto, presso l'Università degli studi di Sassari, Corso di Laurea in Biotecnologie, della materia "Biotecnologie della trasformazione di alimenti di origine animale" nell'anno accademico 2003-2004 e 2004-2005..
- Docente, come Professore a Contratto, presso l'Università degli studi di Sassari, Facoltà di Agraria, Corso di Laurea in Scienze Zootecniche, della materia "Ispezione degli Alimenti di Origine Animale" dall'Anno Accademico 2005-2006 all'Anno accademico 2007-2008.
- Partecipazione a corsi e seminari di aggiornamento nel campo della microbiologia alimentare e del controllo sugli alimenti di origine animale, specialmente sul latte e suoi derivati, nonché a corsi sulla legislazione alimentare e sul sistema qualità.
- Autore di n. circa 40 pubblicazioni scientifiche riportate come comunicazioni a Congressi o pubblicate su riviste nazionali e internazionali, riguardanti argomenti inerenti soprattutto la microbiologia degli alimenti.
- Elenco di alcune pubblicazioni degli ultimi 5 anni:
- Fate of *Listeria monocytogenes* in ripened Ricotta Cheese contaminated in controlled conditions *Fadda A., Addis M., Mele P., Pes M., Furesi S., Rossi L., Terrosu G., Pirisi A.* Atti IDF World Dairy Summit, 2010
- Processing of sheep's milk: application of a HACCP plan for Fiore Sardo (a traditional sardinian cheese). *Terrosu G., Fresi S., Mele P., Rossi L., Tedde T., Porqueddu G., Fadda A.* Atti 4° Congresso Internazionale "Autocontrol y alimentos inocuos para proteger la salud", 2010
- Survey on presence of contaminant and pathogen bacteria in fresh dairy products with abnormal colour - *Terrosu G., Mele P., Assaretti A., Porqueddu G., Delogu A., Rossi M.L., Fadda A.* – XXI Convegno Naz. A.I.V.I., 2011 (Pubblicato rivista online Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 N. 1 pagg. 101-102)
- Studio preliminare sulla presenza di microrganismi patogeni in vegetali di I e IV gamma - *Mele P., Assaretti A., Delogu A., Porqueddu G., Rossi M.L., Terrosu G., Fadda A.* Atti XII XV Congresso Nazionale SIDiLV , 2011
-

- Heat Treatment and Packaging in Ripened Ricotta Cheese: Effects on *Listeria monocytogenes* - Fadda A., Addis M., Mele P., Pes M., Rossi L., Terrosu G., Pirisi A. - Atti IDF International Symposium on sheep, goat and other non-cow milk, 2011
- Survey on the presence of contaminant bacteria in water used in dairy farms - Terrosu Giovanni, Delogu Alida, Mura Elia, Noli Alessia Caterina, Porqueddu Giuseppina, Rossi Maria Lucia, Fadda Antonio – XX Convegno Naz. A.I.V.I., 2012 (Pubblicato rivista online Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 N. 5 pagg. 39-41)
- Presence of *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* in fresh and salted Ricotta cheese: official controls in Sardinia during the period 2009 – 2012 - Fadda Antonio, Delogu Alida, Mura Elia, Noli Alessia Caterina, Porqueddu Giuseppina, Rossi Maria Lucia, Terrosu Giovanni – XX Convegno Naz. A.I.V.I., 2012 (Pubblicato rivista online Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 N. 5 pagg. 43-45)
- Shelf-life study in ripened vacuum packed ricotta cheese. Terrosu G., Fiori M., Mele P., Pirisi A., Rossi M. L., Fadda A. Atti 4° Congresso Internazionale "Autocontrol y alimentos inocuos para proteger la salud", 2012
- Biocontrollo di *Listeria monocytogenes* attraverso l' utilizzo di batteriofagi P100 in ricotta salata prodotta in sardegna. Terrosu G., Pirisi A., Melillo R. , Mura E., Pes M., Rossi M.L., Fadda A. \_XV Congresso Nazionale SIDiLV , 2013
- *Bacillus cereus* and its toxins investigation in fresh and salted Ricotta cheese marketed in Sardinia. Rossi Maria Lucia, Noli Alessia Caterina, Mura Elia, Delogu Alida, Porqueddu Giuseppa, Marongiu Andreina, Fadda Antonio. XXII Convegno Naz. A.I.V.I., 2014
- *Listeria monocytogenes* in environmental samples and dairy products – comparison between UNI EN ISO 11290-1 and VIDAS® LMO2 rapid test - A. Fadda, D. Bezzu, G. Porqueddu, R. Melillo, L. Rossi, G. Terrosu. 3<sup>rd</sup> EAVLD congress, 2014
- Investigation about presence of *L. monocytogenes* in environmental samples collected in dairy plants of Sassari Povince, Italy. Terrosu Giovanni, Fadda Antonio, Frongia Giorgio, Sanna Antonietta, Melillo Rita, Fadda Antonio. *Italian Journal of Food Safety* 2015; volume 4:4578
- Efficacy of bacteriophage P100 treatment to *L. monocytogenes* - G. Terrosu , M.L. Rossi, R. Melillo, G. Porqueddu, A. Pirisi, A. Fadda. - Atti IDF IDF World Dairy Summit, 2015
- Own-check plan revision to prevent fresh ricotta cheese contamination by *Pseudomonas fluorescens* - A. Fadda, A. Delogu, A. Assaretti, A. C. Noli, D. Bezzu, G. Nieddu. Atti IDF World Dairy Summit, 2015

## Descrizione complessiva del progetto

### 1. Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

*L. monocytogenes* è un batterio Gram +, psicrotrofo e anaerobio facoltativo che tende a persistere negli ambienti dei caseifici anche in conseguenza di ripetute sanificazioni. Le sue caratteristiche lo rendono capace di sopravvivere in molti alimenti, anche in condizioni di refrigerazione. Alcuni studi hanno dimostrato la capacità di questo microrganismo di svilupparsi in diversi prodotti lattiero-caseari durante il periodo di conservazione ed in particolare anche dopo il confezionamento sotto-vuoto, come per esempio la ricotta salata. La Listeriosi umana è una zoonosi relativamente rara ma grave che può causare decessi in persone immunodepresse, anziani, neonati ed è particolarmente pericolosa nelle donne in gravidanza nelle quali può causare aborto spontaneo, morte in utero o infezione del feto. La contaminazione con *Listeria monocytogenes* di prodotti lattiero caseari li rende quindi potenzialmente a rischio. Si tratta infatti di alimenti "ready to eat", molti dei quali, per le loro caratteristiche, devono essere considerati nel contesto del regolamento (CE) 2073/2005, prodotti in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*. Negli ultimi anni sono state pubblicate nel sistema RASFF diverse allerte comunitarie che coinvolgevano prodotti lattiero-caseari del territorio regionale per la presenza di *L. monocytogenes*; particolarmente rilevante, per le implicazioni che ha causato, l'episodio della fine del 2012. Ad esso sono collegati diversi focolai di tossinfezioni alimentari anche con casi di mortalità negli Stati Uniti. L'impatto di *L. monocytogenes* è quindi da ritenersi di primaria importanza nel settore della sicurezza alimentare per via della sua letalità come sottolineato dall'Autorità Europea sulla Sicurezza Alimentare. Inoltre episodi di rilevamento del patogeno rischiano di avere importanti ripercussioni anche economiche nei caseifici produttori andando a incidere pesantemente su un settore già in crisi. La presenza di *L. monocytogenes* negli ambienti dei caseifici rappresenta una problematica di estremo interesse. Nel 2014, in seguito alla sopra citata allerta comunitaria, è stato eseguito in collaborazione con la A.S.L. di Sassari un monitoraggio ambientale eseguito su tutti i caseifici della Provincia di Sassari, dal quale emerge come *L. monocytogenes* si confermi un microrganismo capace di proliferare agevolmente in alcuni ambienti dei caseifici con una prevalenza rilevata negli stessi del 10%.

I batteriofagi sono virus capaci di parassitare le cellule batteriche e di provocarne la lisi. Sono state studiate molte applicazioni dei batteriofagi in medicina, sia nella profilassi che nella terapia di malattie batteriche, anche per contrastare l'antibiotico-resistenza che molti agenti patogeni per l'uomo hanno sviluppato nei confronti delle più comuni molecole in uso. Recentemente molte ricerche si sono concentrate sull'utilizzo dei batteriofagi negli alimenti. La capacità litica dei fagi nei confronti delle cellule ospiti era nota già dall'inizio del secolo scorso, ma l'applicazione nel campo alimentare necessitava della conferma della loro azione nel substrato alimentare. Il fine può essere quello di controllare lo sviluppo della flora contaminante, per prolungare la shelf-life oppure per garantire la sicurezza alimentare attraverso il biocontrollo degli eventuali agenti patogeni presenti. Diversi studi che hanno confermato l'efficacia dei fagi hanno portato la Food and Drug Administration nel 2006 ad approvare l'uso di un preparato composto da un pool di fagi purificati da poter usare come agente antimicrobico contro *L. monocytogenes* in prodotti ready to eat, carne e pollame. Questo documento segna la prima regolamentazione dell'uso dei fagi in prodotti alimentari, classificandoli come additivi. È necessario ricordare che i batteriofagi sono onnipresenti, rappresentano una delle entità biologiche più abbondanti in natura e sono quindi accidentalmente, ma regolarmente, consumati attraverso l'ingestione di acqua e cibo senza che siano mai stati segnalati effetti indesiderati. Per quanto riguarda l'utilizzo dei listeriofagi, i batteriofagi A511 e

P100 sono stati valutati in diverse matrici alimentari, su formaggi (Carlton et al., 2005), mozzarella e altre matrici alimentari carnee (Guenther et al., 2009; Guenther et al., 2011) ottenendo sempre un effetto decontaminante. Il P100, commercializzato in Europa, ed oggetto di un parere dell' EFSA a seguito di una richiesta della Commissione Europea al Gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici (Gruppo BIOHAZ). L' isolamento e la caratterizzazione del Listeriofago litico P100, virus della Famiglia dei Myoviridae è avvenuta dalle acque di scarico di un caseificio nel sud Germania. In Italia non è ancora stato autorizzato l' utilizzo dei trattamenti decontaminanti con batteriofagi sugli alimenti, tuttavia questo strumento può essere anche utilizzato per il controllo della crescita del patogeno sulle superfici di lavorazione e come agente di prevenzione per lo sviluppo di biofilms. I fagi utilizzati nel campo della sicurezza alimentare devono essere necessariamente caratterizzati per conoscerne il genoma al fine di valutare appieno la sua idoneità per l' utilizzo come decontaminante nell' industria alimentare.

Recentemente il Laboratorio Microbiologia Latte e Derivati ha condotto diverse ricerche finalizzate prima a saggiare il comportamento del P100 in colture di *Listeria monocytogenes* in *Brain Heart Infusion* e in latte intero, poi a verificarne l' utilizzo per il biocontrollo del patogeno in ricotta salata ed infine a studiare l' applicazione di questo tipo di trattamento per la decontaminazione delle superfici e la prevenzione della formazione di biofilms.

## **2. Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre**

Il progetto si prefigge la ricerca, l' isolamento e la caratterizzazione di batteriofagi in campioni provenienti dagli ambienti dei caseifici del territorio regionale. In questo contesto l' isolamento e la caratterizzazione di listeriofagi appare rilevante in prospettiva di un loro utilizzo come decontaminanti anche sulle superfici di lavoro e negli utensili a contatto con i prodotti che possono rappresentare una importante fonte di contaminazione.

L' utilizzo di listeriofagi isolati negli ambienti di lavorazione da utilizzare come strumento di biocontrollo del patogeno risponderebbe ad una duplice esigenza. La prima è quella di mettere a punto sistemi di controllo del microrganismo alternativi ai disinfettanti ed antibiotici rispondendo alla necessità di non creare ceppi resistenti; infatti la resistenza antimicrobica rappresenta oggi una minaccia reale per la salute pubblica, preoccupazione che emerge come duro avvertimento dal rapporto del 2014 dell'OMS che evidenzia un vasto e rapido sviluppo delle resistenze agli antibiotici e ad altri agenti antimicrobici in ogni regione del mondo e rimarca l' esigenza di mettere a punto strategie alternative al loro utilizzo. La seconda esigenza è quella di individuare e successivamente impiegare fagi dotati di elevata specificità che si sono adattati ai sierotipi di *L. monocytogenes* circolanti negli ambienti del caseificio, ottimizzandone l' efficacia.

## **3. Metodologia**

Il progetto si sviluppa attraverso le seguenti fasi e sottofasi:

### 1. Fase preliminare

1.1. Individuazione dei caseifici coinvolti nel progetto;

1.2. Sopralluoghi dei caseifici selezionati;

1.3. Individuazione delle aree di prelievo per ciascun caseificio secondo il layout produttivo e le eventuali non-conformità precedentemente rilevate;

### 2. Raccolta dei campioni

- Campioni ambientali: utilizzo di tamponi o sponge per il prelievo di contaminazione superficiale su un area di 100 cm<sup>2</sup>

- Campioni di reflui di caseificio: raccolta di 250 ml di acque di scarico
3. Analisi dei campioni prelevati
- 3.1. Selezione e coltivazione dei ceppi di *L. monocytogenes* selezionati (3 di campo e 3 di referenza) da utilizzare per l'isolamento dei batteriofagi
  - 3.2. Isolamento di batteriofagi mediante tecniche colturali (metodo delle placche di lisi)
  - 3.3. Purificazione e titolazione dei batteriofagi
  - 3.4. Caratterizzazione dei fagi isolati
    - 3.4.1. Microscopia elettronica per la determinazione della morfologia
    - 3.4.2. Valutazione dell'attività litica e della *host specificity* dei batteriofagi
    - 3.4.3. Estrazione e purificazione degli acidi nucleici
    - 3.4.4. Identificazione mediante analisi genetiche quali random priming PCR, PFGE, utilizzo di enzimi di restrizione

#### 4. **Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire**

Questo studio rappresenta una rilevante indagine conoscitiva che consentirebbe di individuare gli eventuali fagi con attività specifica nei confronti di *L. monocytogenes* presenti negli ambienti dei caseifici. La conoscenza del comportamento dei fagi e la valutazione della loro efficacia nei prodotti della filiera lattiero-casearia importanti nella nostra realtà regionale, ed in particolare di alcuni prodotti lattiero-caseari come la ricotta salata, sensibili allo sviluppo di *L. monocytogenes*, è rilevante proprio in prospettiva di un loro futuro utilizzo. La valutazione della loro reale efficacia apre la strada a possibili impieghi come decontaminanti nelle superfici di lavoro e negli utensili a contatto con i prodotti che rappresentano una importante fonte di contaminazione di *L. monocytogenes*, risultando in definitiva un valido strumento di supporto per l'OSA nella gestione dell'autocontrollo. Inoltre l'elevata specificità di batteriofagi isolati all'interno degli stabilimenti di produzione rispetto a quelli presenti attualmente in commercio costituirebbe un indubbio vantaggio in termini di efficacia nella pratica. La possibilità di utilizzare batteriofagi per il controllo della crescita di *L. monocytogenes* nelle superfici di lavorazione risponde anche all'esigenza di utilizzare mezzi alternativi rispetto alla disinfezione e sanificazione rispondendo alla necessità di limitare fenomeni di resistenza microbica.

#### 5. **Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise, Reparto di Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale: la collaborazione riguarderebbe la Fase dell'Analisi dei Campioni e consentirebbe di sviluppare maggiori competenze nelle tecniche di isolamento e identificazione dei batteriofagi e nella valutazione della loro efficacia.

Aziende Sanitarie Locali competenti per territorio, Servizio di Igiene degli Allevamenti: la collaborazione riguarderebbe la Fase Preliminare e di Raccolta dei Campioni consentendo di gestire le procedure di individuazione dei caseifici e di campionamento con maggiore efficienza.

#### 6. **Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione**

- Comunicazione a congressi, pubblicazioni scientifiche, pubblicazione sui siti internet dell'Ente
- Produzione di nuove metodiche e procedure per la ricerca, l'isolamento e l'identificazione dei batteriofagi
- Trasferimento delle conoscenze mediante l'organizzazione di convegni, corsi e incontri

#### 7. **Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti**

L'obiettivo generale è quello di acquisire nuove conoscenze sulla eventuale presenza negli ambienti di caseifici del territorio regionale di batteriofagi specifici per *L. monocytogenes* e nel contempo di fornire alle aziende produttrici di innovative metodiche utili a prevenire la contaminazione dei propri prodotti e ottimizzare le procedure igieniche nell'ambito del processo produttivo. Indicatori per la verifica dei risultati raggiunti saranno le relazioni intermedia e finale.



## Cronogramma del progetto

FASI	MESI																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1.1	■																							
1.2		■	■																					
1.3				■																				
2					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						
3.1					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
3.2					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
3.3												■	■	■	■	■	■	■	■	■				
3.4.1																					■	■	■	■
3.4.2															■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3.4.3												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3.4.4															■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

**Tabella n. 1**

**Titolo del progetto:** Ricerca, isolamento e caratterizzazione di batteriofagi in ambienti di caseifici per il biocontrollo di *Listeria monocytogenes* nelle imprese alimentari.

**Durata del progetto** (espressa in mesi): 24

**Responsabile scientifico** *Cognome* **Fadda**

Nome **Antonio**

VOCE DI SPESA	Importo	Descrizione
Borsa di studio		Laureato a contratto x 24 mesi

Firma del Responsabile Scientifico del progetto

