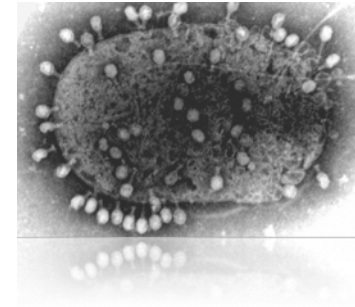




IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Caratterizzazione e valutazione *in vitro*
dell'attività del fago ϕ IZSAM-1 nei confronti
di *Listeria monocytogenes*

CIFIV, 15/12/2015

Giuseppe Aprea (g.aprea@izs.it)

Arianna Boni

Daniela D'Angelantonio





May 6, 2011

Mr. Robert Hibbert
K&L Gates
1601 K Street, N.W.
Washington, DC 20006-1600

Dear Mr. Hibbert:

This letter is in response to your December 17, 2010, notification on behalf of EBI Food Safety requesting the Food Safety and Inspection Service's (FSIS) reconsideration of its previous processing aid determination that required labeling of their bacteriophage product. Specifically, you requested that FSIS consider EBI Food Safety's (EFS) bacteriophage product, marketed under the trade name, Listex P100, as a processing aid to reduce *Listeria monocytogenes* (LM) in ready-to-eat (RTE) meat and poultry products and not require labeling.

Therefore, FSIS has no objection to the use of EBI Food Safety's (EFS) bacteriophage product, marketed under the trade name, Listex P100, as a processing aid to reduce *Listeria monocytogenes* (LM) in ready-to-eat (RTE) meat and poultry products without requiring labeling when applied to the surface of the product to achieve a level of 1×10^7 to 1×10^9 plaque forming units (pfu) per gram of product. However, standardized

SCIENTIFIC OPINION

The use and mode of action of bacteriophages in food production¹

Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards

(Question No EFSA-Q-2008-400)

Endorsed by the BIOHAZ Panel for public consultation 22 January 2009

Public consultation 30 January – 6 March 2009²

SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish¹

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)^{2,3}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

When evaluating the safety and efficacy of Listex™ P100 to reduce *Listeria monocytogenes* contamination on raw fish were assessed. The material should not present human toxicological problems because the bacteriophage P100, used as active principle, is not regarded as harmful to consumers nor to organisms other than *Listeria* spp., and because the fabrication parameters do not include anything obvious that might compromise safety. Data of studies considered indicate that Listex™ P100 is listericidal on inoculated catfish and salmon samples, but do not allow definitive conclusions on efficacy in reducing *L. monocytogenes* counts on raw fish nor on its impact on *L. monocytogenes* contamination levels in finished product. It was not possible to estimate the potential listeriosis risk reduction by treating raw fish with Listex™ P100. The data were not adequate to allow firm conclusions on persistence or



FINANZIAMENTO: MSRC02/11

- Isolamento di 5 pool di fagi
- Valutazione spettro d'ospite, caratterizzazione morfologica, SDS PAGE, NGS, prove di efficacia *in vitro*

φIZSAM-1



φ10022/27, φ010120/1

φ72, φ73



Caratteristiche e spettro d'ospite dei pool di fagi isolati

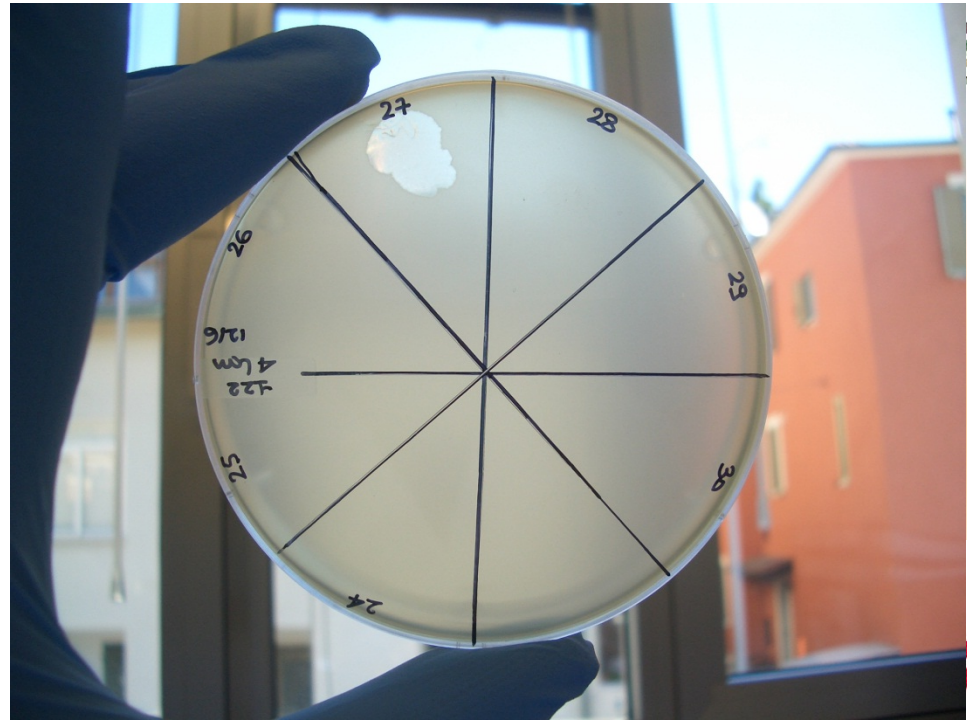
Identificazione pool fagi	Matrice	Totale placche pure	Ceppi testati per spettro d'ospite	Ceppi sensibili	Caratterizzazione morfologica T.E.M.
φIZSAM-1	Acque pozzetto caseificio gorgonzola X	7	Tutti i ceppi della tabella 1	Tutti i ceppi della tabella 1	Ordine Caudovirales, famiglia Siphoviridae
φ10022-27	Tampone superfici caseificio XX	4	Ceppi ATCC ed NCTC della tabella 1	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	Ordine Caudovirales, famiglia Siphoviridae
φ010120-1	Acque pozzetto caseificio XX	4	Ceppi ATCC ed NCTC della tabella 1	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	non eseguito
φ72	Concimaia allevamento bovino Y	4	Ceppi ATCC ed NCTC della tabella 1	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	non eseguito
φ73	Concimaia allevamento bovino Z	4	Ceppi ATCC ed NCTC della tabella 1	<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	non eseguito

Table 2. CASE B: Sampling sites and microbiological results. *L. monocytogenes* was investigated in surfaces swabs (30 samples). Bacteriophages were investigated in drain water samples (samples n. 17 and 26) and in all surface swabs.

Cheese plant working area	Surfaces	Results	
	1. Curdling tank	-	
	2. Curdling tank	-	
	3. Milk pipe to curdling tank	-	
	4. Stainless steel curdling tool	-	
	5. Stainless steel curdling tool	-	
	6. Stainless steel curdling tool	-	
	7. Sink	-	
	8. Handrails	-	
Cheese making area	9. Cutting machine (tape)	-	
	10. Cutting machine (grid)	-	
	11. Cutting machine (not contact surface)	11- <i>L. monocytogenes</i> serovar 1/2a	
	12. Table	-	
	13. Table	-	
	14. Sink	-	
	15. Wall	-	
	16. Plastic stencil	-	
		17. Drain + water	Phage 010120/1
	'Ricotta' making area	18. Whey pipe	-
	19. Drain + water	-	
'Ricotta' storage area	20. Stainless steel shelf	-	
	21. Door handle	-	
'Pecorino' salting area	22. Salting machine	-	
	23. Wood shelf	-	
	24. Wall	-	
	25. Tape under vacuum machine	-	
	26. Drain + water	-	
Cutting/packaging area	27. Cutting machine (food contact surface)	Phage 10022/27 + 27- <i>L. monocytogenes</i> serovar 4b	
	28. Cutting machine	-	
Dressing room	29. Shoes	-	
	30. Cabinet	-	

Table 4. *L. monocytogenes* strains used for the isolation of ϕ 010120/1 and ϕ 10022/27 and qualitative host range assessment of ϕ IZSAM-1, ϕ 010120/1 and ϕ 10022/27.

	NCTC 1/2b (1LM)	ATCC 1/2c (13M)	NCTC 4c (3LM)	ATCC 4b (4LM)	NCTC 1/2a (11LM)	ATCC 4a (12LM)	11- <i>L. monocytogenes</i> serovar 1/2a	27- <i>L. monocytogenes</i> serovar 4b
ϕ IZSAM-1	+	++++	++	+	++++	++	-	-
ϕ 010120/1	-	-	++	+++	-	++	-	+
ϕ 10022/27	-	-	++	++++	-	++	-	-



Order
y Siphoviridae,
nm, tail 170 nm,
m.

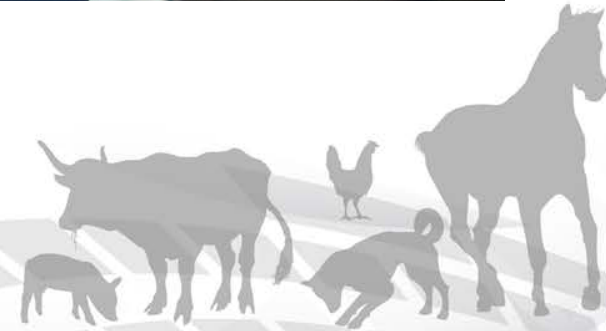
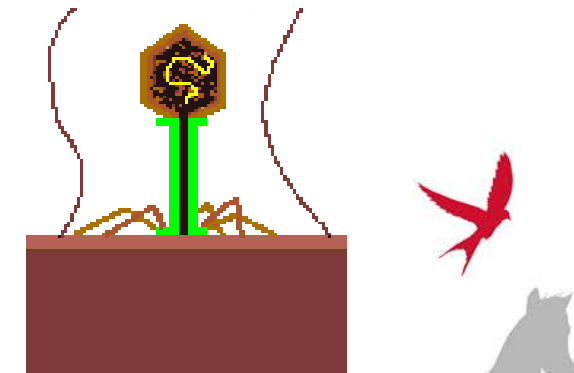


Table 4. *L. monocytogenes* strains used for the isolation of ϕ 10120/1 and ϕ 10022/27 and qualitative host range assessment of ϕ IZSAM-1, ϕ 10120/1 and ϕ 10022/27.

	NCTC 1/2b (1LM)	ATCC 1/2c (13M)	NCTC 4c (3LM)	ATCC 4b (4LM)	NCTC 1/2a (11LM)	ATCC 4a (12LM)	11- <i>L. monocytogenes</i> serovar 1/2a	27- <i>L. monocytogenes</i> serovar 4b
ϕ IZSAM-1	+	++++	++	+	++++	++		
ϕ 10120/1	-	-	++	+++	-	++	-	+
ϕ 10022/27	-	-	++	++++	-	++	-	-

ϕ IZSAM-1: Spettro d'ospite



N.	Ceppi	Sierotopo	Origine
1	<i>L. monocytogenes</i> NCTC10887	½ b	NCTC
2	" ATCC7644	½ c	ATCC
3	" NCTC4883	4 c	NCTC
4	" ATCC19115	4 b	ATCC
5	" NCTC4886	½ a	NCTC
6	" ATCC19114	4 a	ATCC
7	"	Non riportato	Formaggio
8	"	Non riportato	Tamponi ambientali
9	"	Non riportato	Carne bovina
10	"	Non riportato	Carne bovina
11	"	Non riportato	Carne bovina
12	"	Non riportato	Salmone
13	"	Non riportato	Prosciutto affumicato
14	"	Non riportato	Prosciutto affumicato
15	"	Non riportato	carne bovina
16	"	Non riportato	Carne macinata di suino
17	"	Non riportato	Pangasius
28	"	Non riportato	Liquido cefalorachidiano umano
19	"	Non riportato	Pollo
20	"	Non riportato	Salmone affumicato
21	"	Non riportato	Salmone affumicato
22	"	Non riportato	Salsiccia fresca suina
23	"	Non riportato	Salsiccia fresca suina

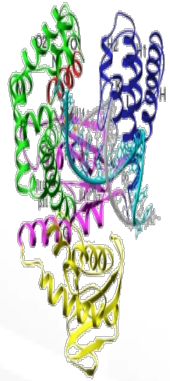
Analisi del genoma del fago IZSAM-1-3G (NGS)



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Il sequenziamento ha prodotto 5337447 “reads” utili per l’assemblaggio

- Dopo i controlli previsti per la verifica della qualità dei dati prodotti, è stato ottenuto un solo «contig» di 50021 nucleotidi con un “coverage” maggiore di 4000X, ciò ha permesso di concludere che il genoma del fago in questione aveva una grandezza di circa **50 kbp**
- La ricerca nel database internazionale ha permesso di identificare il fago LP-101 (KJ094023) come quello più vicino geneticamente ad IZSAM-1-3G. I due genomi hanno mostrato un’identità di circa 46 %
- L’annotazione funzionale di tutto il genoma verrà condotta nel prossimo futuro

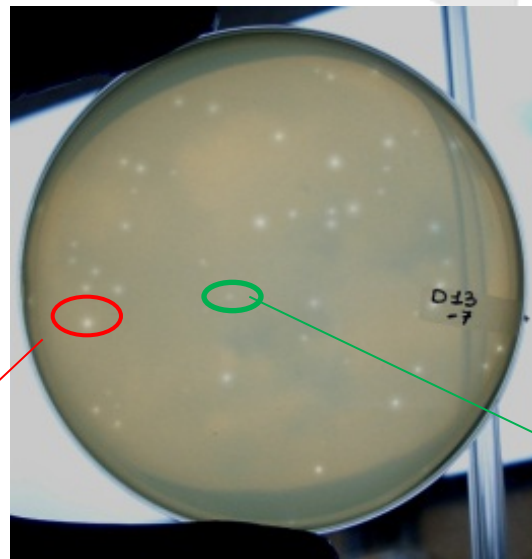




Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale

Fago IZSAM-1: 1: Purificazione delle placche

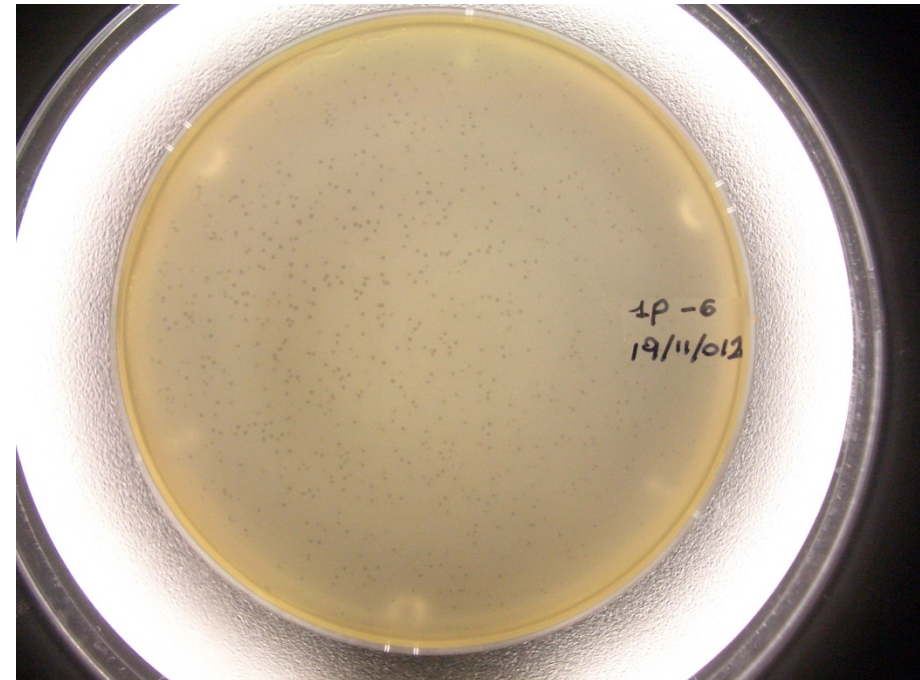
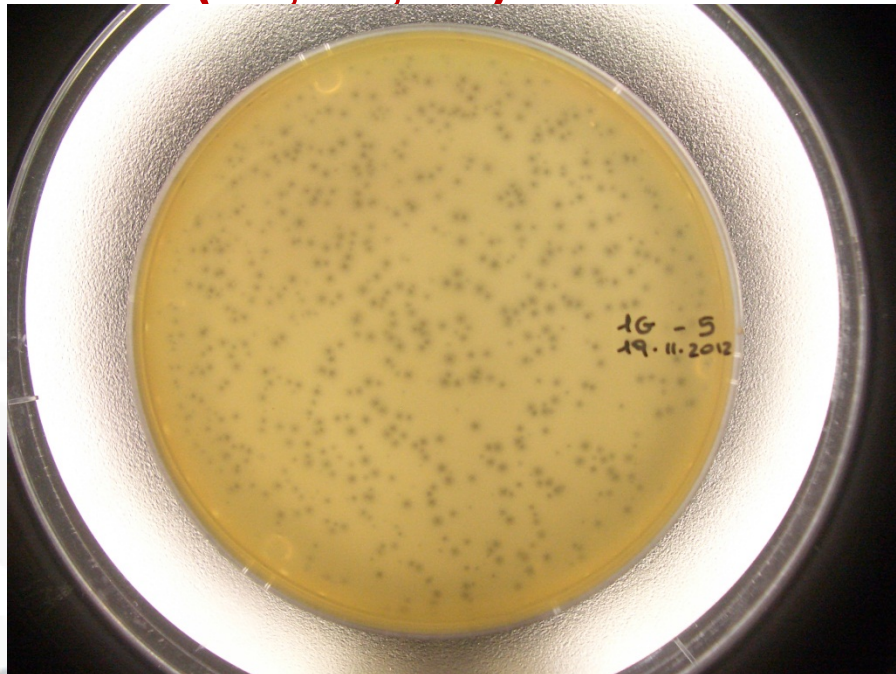
Φ 3 placche
GRANDI
(1G; 2G; 3G)



8 placche x
3 cicli di purificazione



Φ 4 placche PICCOLE
(1P; 2P; 3P; 4P)



7 FAGI PURI da sottoporre alle prove di efficacia *in vitro*

MeM

IZSAM-1: Prove di efficacia *in vitro*

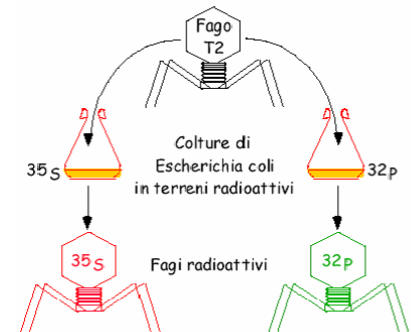
Ospite batterico: *L. monocytogenes* ATCC7644 (1/2c)

Formulazioni fagiche utilizzate: Pool ϕ IZSAM-1, Cocktail di fagi puri (insieme dei sette fagi puri derivanti dalla purificazione delle placche), sette fagi puri utilizzati singolarmente

MOI: 10, 1, 0,1, 0,01

SUPPORTO: Piastre da 24 pozzetti

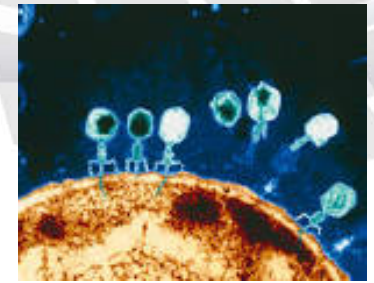
METODICA: Lettura spettrofotometrica (OD 600nm), e titoli Fago e Listeria (ISO 11290-2:98 AMD 04)





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Conclusioni



L'ampio spettro d'ospite di ϕ IZSAM-1 e la sua peculiare attività anti-*Listeria monocytogenes* suggeriscono due possibili modi di utilizzo:

- il pool fago ϕ IZSAM-1 ed il cocktail di fagi, per la loro capacità di controllare efficacemente *L. monocytogenes* per breve tempo, potrebbero essere applicati per la "decontaminazione" di prodotti RTE appena prima del loro consumo
- la capacità dei singoli fagi puri, e in particolare di ϕ IZSAM-1-3G, di controllare *L. monocytogenes* per tempi più lunghi e di limitare lo sviluppo di ceppi di *Listeria* fago resistenti potrebbe essere impiegato nel "bio-controllo" del patogeno lungo la catena di produzione dei formaggi, come valido strumento di integrazione per "Good Manufacturing Practices "



Ringraziamenti speciali :

Arianna Boni, Daniela D'Angelantonio, Noemi Battistelli, Krizia D'Agostino, Silvia Scattolini

- Anna Rita D'Angelo, Miriam Berti: **TEM**
- Cesare Cammà, Maurilia Marcacci, Iolanda Mangone e Massimiliano Orsini per il supporto «**biotecnologico**»

