



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

***Listeria monocytogenes* isolata da nuove matrici**

Violeta Di Marzio Cristina Marfoggia Angelo Gino Santarelli

Giornata di studio: «Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la *Listeria monocytogenes*»
Teramo, 14 Dicembre 2017



Perché è importante cercare *Listeria monocytogenes* in campioni diversi da alimenti e tamponi ambientali?

- Rilevare *L. monocytogenes* nell'ambiente
- Rilevare *L. monocytogenes* in nuove matrici
- Identificare animali selvatici serbatoio di *L. monocytogenes*
- Capire come *L. monocytogenes* viene dall'ambiente fino alla filiera di produzione degli alimenti
- Identificare l'importanza dei suini allevati quali serbatoi di *L. monocytogenes* (nelle feci di suini sia di allevamento industriale che domestico)



Esperienze in corso: Progetto SUSHIN

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

SUSHIN (Sustainable fiSH feeds INnovative ingredients) è un progetto triennale finanziato da AGER che punta alla ricerca di nuovi ingredienti da utilizzare nei mangimi per le principali specie ittiche allevate in Italia.

L'obiettivo del progetto è quello di valutare l'alimentazione di varie specie ittiche con l'introduzione di diete innovative basate su farine ottenute da **insetti, crostacei, micro-alghe e sottoprodotti della macellazione degli avicoli.**



FONDAZIONI IN RETE
PER LA RICERCA
AGROALIMENTARE



SUSHIN
SUSTAINABLE FISH FEEDS
INNOVATIVE INGREDIENTS

Giornata di studio: «Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la *Listeria monocytogenes*»





Progetto SUSHIN

 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Vengono valutati il valore nutritivo dei nuovi mangimi, la loro qualità e la **SICUREZZA ALIMENTARE (IZSAM)**

Del reperimento e della caratterizzazione sanitaria e organolettica di questo ingrediente si sono occupati l'IZSAM e il CREA di Monterotondo.

Parallelamente alle attività di prelievo sono state condotte analisi di tipo sanitario-ispettivo presso la Sede Centrale dell'IZSAM e analisi di tipo nutrizionale nei laboratori della sede di Monterotondo del CREA-ZA.



FONDAZIONI IN RETE
PER LA RICERCA
AGROALIMENTARE



SUSHIN
SUSTAINABLE FISH FEEDS
INNOVATIVE INGREDIENTS

Giornata di studio: «Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la *Listeria monocytogenes*»



Campioni esaminati




- 5 campioni di **Gambero rosso della Louisiana** (*Procambarus clarkii*)
- 5 campioni di **farina di pollo**
- 2 campioni di **farina di insetti**
- 1 campione di **farina di alghe**
- 1 campione di **farina di gamberetti**





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Progetto «Listadapt»

- 
- a) Listadapt è un progetto innovativo e multidisciplinare che ha lo scopo di chiarire quali geni e meccanismi molecolari sono alla base dell'adattamento di *L. monocytogenes* alle sue diverse nicchie ecologiche, in quanto l'ecologia di *L. monocytogenes* è ancora poco conosciuta.
- b) Alla base del progetto ci sarà il confronto tra i dati genotipici e fenotipici ricavati da ceppi isolati da ambienti, animali, alimenti e casi clinici di diversi paesi europei.
- c) Il progetto, permetterà di acquisire informazioni sull'adattamento, l'evoluzione e la composizione genetica di ceppi che moltiplicano in alcune nicchie ambientali e non in altre. Cercando di capire quali sono i fattori chiave che conferiscono a *L. monocytogenes* la proprietà di colonizzare ambienti particolari.
- 
- 

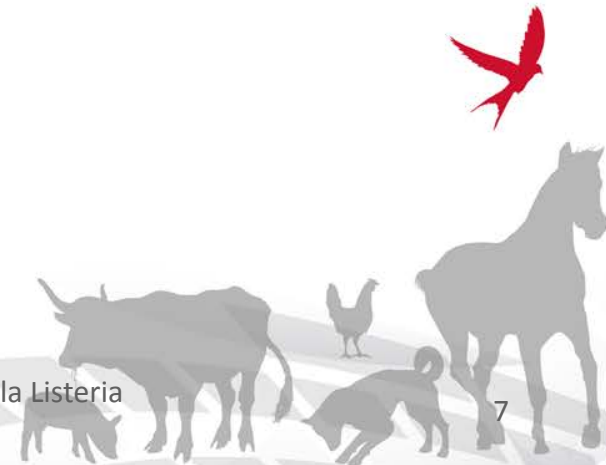


 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Campioni esaminati:

- 159 campioni di feci (cinghiale e volpe)
- 36 campioni di chiocciole

Progetto «Listadapt»



Materiali e metodi

a) Tutti i campioni sono stati analizzati per la ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. seguendo la **ISO 11290:2017**

1° arricchimento:

25g campione +
225ml Brodo Demi
Fraser + suppl.

30°C x 24h

2° arricchimento:

- 0,1 ml brodo 1° arricchimento in 10ml Brodo Fraser + suppl.;
- Semina su ALOA e OXFORD Agar.

37°C x 48h

Isolamento colonie tipiche
sospette

37°C x 24h

Conferma delle
colonie tipiche:
emolisi, catalasi,
identificazione
biochimica (VITEK)

Materiali e metodi

I ceppi di *Listeria* spp., una volta identificati sono stati passati in microbank e stoccati a -80°C

I ceppi identificati come *L. monocytogenes* sono stati sottoposti alle seguenti prove di caratterizzazione

- **Determinazione del sierogruppo** (PCR multiplex)
- **Sierotipizzazione** (tipizzazione sierologica dell'antigene flagellare H e del somatico O)
- **PFGE** (Pulsed field gel electrophoresis)

Per ogni campione positivo (se presenti) sono stati isolati e caratterizzati 5 ceppi.

Campioni positivi:

Progetto SUSHIN

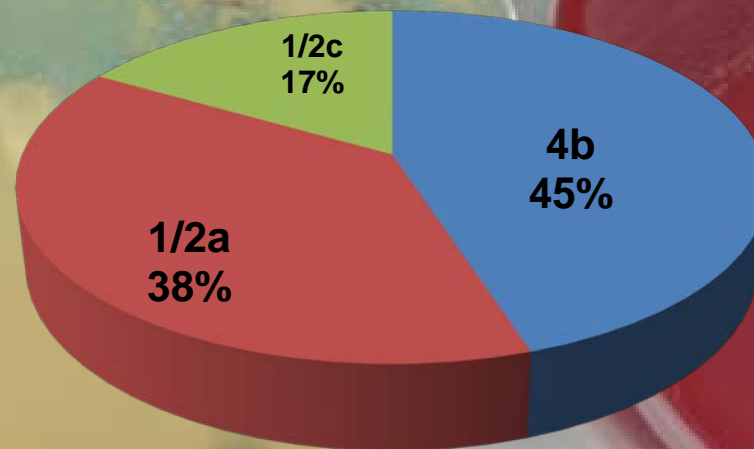
1 *Listeria* spp. (*Listeria innocua*)
zero *Listeria monocytogenes*

Progetto Listadapt

3 *Listeria* spp. (2 *Listeria seeligeri*, 1 *Listeria ivanovii*)
20 *Listeria monocytogenes*
(17 da feci cinghiale, 3 feci volpe)

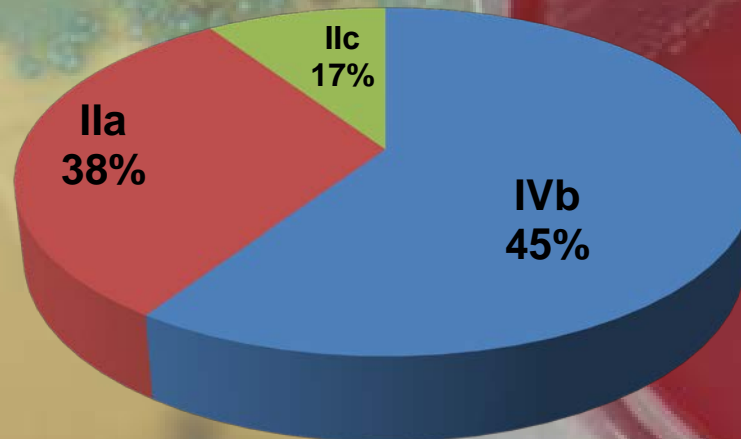
64 ceppi caratterizzati

❖ SIEROTIPO: 27 ceppi 4b; 23 ceppi 1/2a,
10 ceppi 1/2c



64 ceppi caratterizzati

❖ SIEROGRUPPO: 38 ceppi IVb; 20 ceppi IIa; 6 ceppi IIc



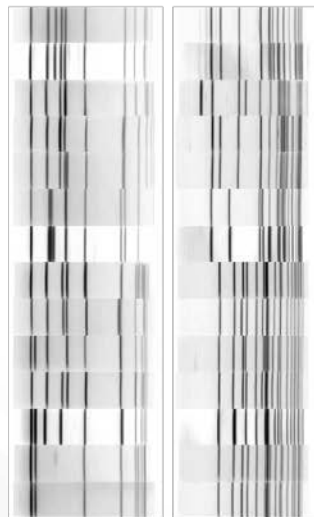
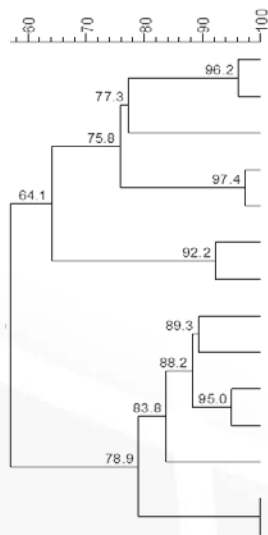
PFGE: Dendrogramma relativo ai 14 ceppi isolati da feci animali del progetto Listadapt.

La similarità tra i profili in esame è stata calcolata applicando parametri di ottimizzazione e tolleranza fissati all'1%. La clusterizzazione è stata effettuata utilizzando il metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis with Averages)

Ascl +Apal

PFGE Ascl

PFGE Apal



Source	City	Pulsotipo_Ascl	Pulsotipo_Apal
CINGHIALE	SECINARO	GX6A16.0007	GX6A12.0001
SUINO	PENNAPIEDIM.	GX6A16.0007	GX6A12.0007
SUINO	ORTONA	GX6A16.0005	GX6A12.0144
SUINO	TREGLIO	GX6A16.0090	GX6A12.0186
SUINO	ALTINO	GX6A16.0232	GX6A12.0186
CINGHIALE	MOLINA ATERNO	GX6A16.0072	GX6A12.0026
VOLPE	PESCASSEROLI	GX6A16.0195	GX6A12.0138
SUINO	PIZZOFERRATO	GX6A16.0081	GX6A12.0016
VOLPE	BARETE	GX6A16.0008	GX6A12.0003
SUINO	LANCIANO	GX6A16.0151	GX6A12.0194
SUINO	ROCCASCALE.	GX6A16.0185	GX6A12.0278
VOLPE	SCOPPITO	GX6A16.0272	GX6A12.0392
SUINO	ORTONA	GX6A16.0043	GX6A12.0193
SUINO	FILETTO	GX6A16.0043	GX6A12.0193

Conclusioni

- a) **Progetto Sushin:** In tutti i campioni analizzati per il progetto SUSHIN non è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes*, probabilmente non vi è presenza del patogeno in quegli ambienti di pesca ma resta importante l'indagine perché *L. monocytogenes* è presente nelle acque dolci quindi potrebbe arrivare alle acque di fiume ed entrare nel processo produttivo dei mangimi destinati all'alimentazione dei gamberi.
- b) **Progetto LISTADAPT:** I risultati dimostrano che *L. monocytogenes* è presente negli animali selvatici attraverso i quali diffonde nell'ambiente e può entrare nella filiera alimentare.
- Dai risultati della PFGE emerge la grande variabilità dei ceppi.
 - Solo due ceppi sono riferibili allo stesso pulsotipo e si riferiscono a feci di cinghiale campionate nella stessa provincia ma in comuni diversi.

Conclusioni

- La ricerca delle fonti di contaminazione è di importanza primaria negli studi epidemiologici che riguardano la diffusione di *L. monocytogenes*
- La malattia è sporadica e il numero dei casi umani è basso (2300 circa in EU all'anno), l'interesse nella malattia nell'uomo è determinata dai danni (costi), negli USA è la 3° malattia per i costi sostenuti riferiti a paziente ospedalizzato.

Si ringraziano per la collaborazione:

- Vicdalia Acciari
- Gabriella Centorotola
- Marina Torresi



Altri colleghi che partecipano alle attività di ricerca

- Riccardo Caprioli e Carla Giansante (Progetto Sushin)
- Nadia Sulli e tutta la sezione di Avezzano (Progetto Listadapt)

GRAZIE PER L'ATTENZIONE E BUON NATALE!!