IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Produzione di biofilm, determinazione della MIC e del tempo di inattivazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* in vitro

Patrizia Centorame

Teramo 4 Luglio 2019: Workshop del Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*.

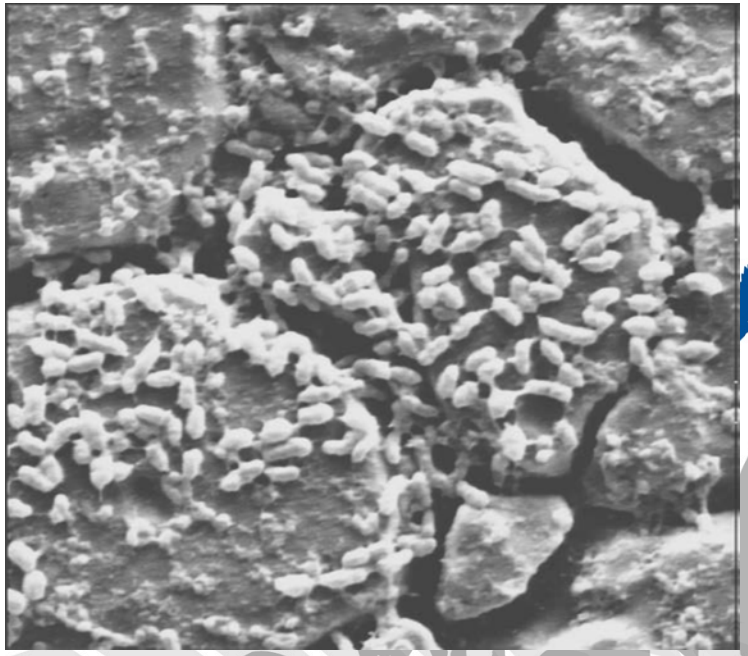
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

INTRODUZIONE

La colonizzazione di attrezzature e delle superfici di lavorazione favoriscono la (re)contaminazione dei prodotti aumentando i rischi sulla sicurezza alimentare.

Ad oggi non sono ancora disponibili sostanze in grado di interferire sul «quorum sensing» al fine di evitare la formazione del biofilm.



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Obiettivi dello studio

- Valutare la capacità di produrre biofilm in vitro da parte di 10 ceppi persistenti di *L. monocytogenes* appartenenti a 4 differenti pulsotipi combinati prevalenti (rilevati in aziende abruzzesi e molisane). Per ogni pulsotipo prevalente, isolato da una stessa azienda, sono stati scelti due ceppi isolati uno da superfici a contatto (FCS) e l'altro da superfici non a contatto (NFCS).

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Obiettivi dello studio

- Studi di biofilm a 12°C e 30°C.
- Determinazione della **MIC** del benzalconio cloruro (BC) *vs* questi ceppi.
- Attività di inattivazione a differenti concentrazioni di BC e a differenti temperature, sia su *L.m.* in fase planctonica che in fase bentonica (biofilm formato).

«Per meglio comprendere i meccanismi legati alla formazione di biofilm di *L.m*.»

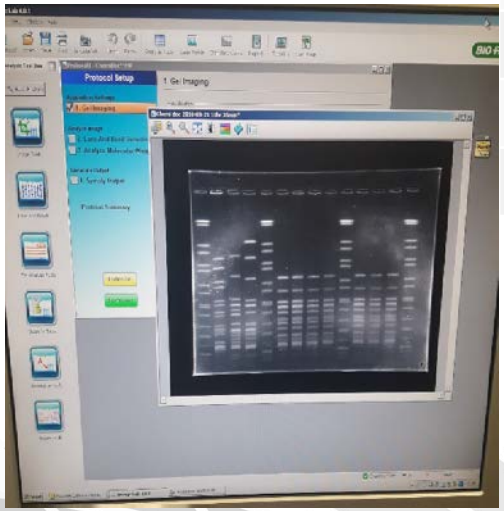
Materiali e metodi
ceppi batterici utilizzati, determinazione sierotipo e pulsotipo

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

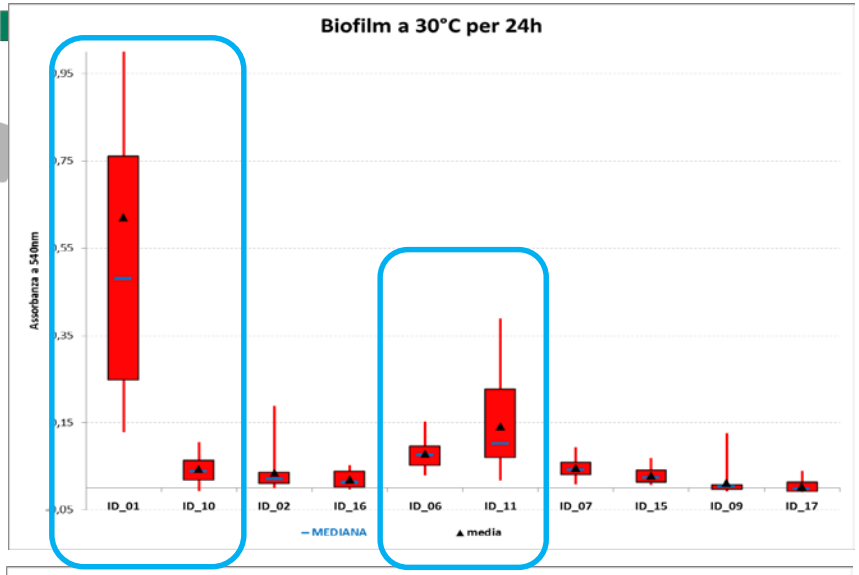
Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

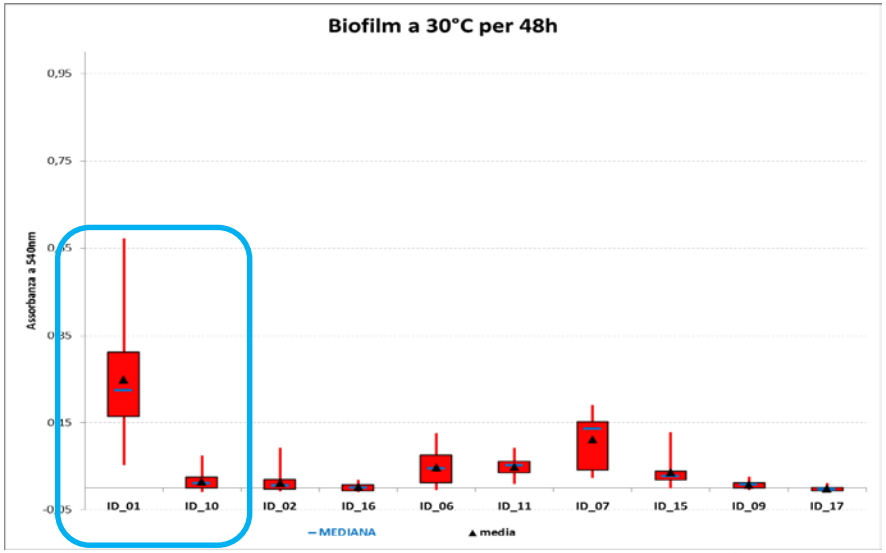
IDENTIFICATIVO AZIENDA	AZIENDA	IDENTIFICATIVO CEPPO	TIPO DI SUPERFICIE	PULSOTIPO COMBINATO	SIEROTIPO
1	pbc	ID01	FCS	GX6A12.0001/GX6A16.0007	1/2c
1	pbc	ID10	NFCS	GX6A12.0001/GX6A16.0007	1/2c
2	pbl	ID02	FCS	GX6A12.0005/GX6A16.0009	1/2b
2	pbl	ID16	NFCS	GX6A12.0005/GX6A16.0009	1/2b
3	pbc	ID06	FCS	GX6A12.0001/GX6A16.0007	1/2c
3	pbc	ID11	NFCS	GX6A12.0001/GX6A16.0007	1/2c
4	pbc	ID07	FCS	GX6A12.0047/GX6A16.0024	1/2b
4	pbc	ID15	NFCS	GX6A12.0047/GX6A16.0024	1/2b
4	pbc	ID09	FCS	GX6A12.0349/GX6A16.0255	1/2b
4	pbc	ID17	NFCS	GX6A12.0349/GX6A16.0255	1/2b

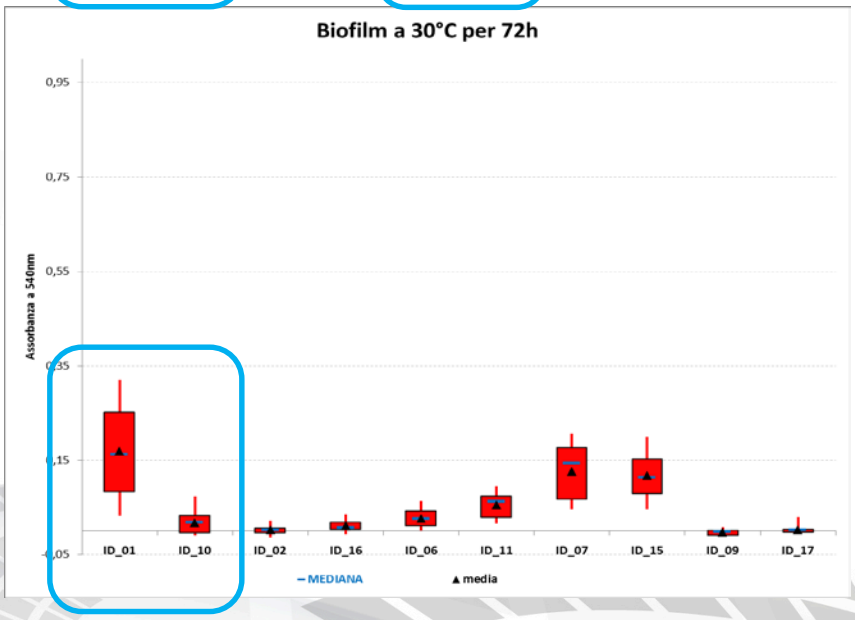
SESSIONE DI CAMPIONAMENTO	ID. CEPPO	**REPARTO DI PRELIEVO**	**TIPO DI PRELIEVO** (Matrice del campione)
seconda sessione	ID01	Insacco	Utensile
terza sessione	ID10	Impianto	Impianto
quarta sessione	ID02	Coagulazione	Attrezzatura
seconda sessione	ID16	Coagulazione	Impianto
seconda sessione	ID06	Insacco	Attrezzatura
terza sessione	ID11	Insacco	Abbigliamento
terza sessione	ID07	Insacco	Attrezzatura
terza sessione	ID15	Confezionamento	Macchinari
prima sessione	ID09	Insacco	Attrezzatura
quarta sessione	ID17	Confezionamento	Attrezzatura

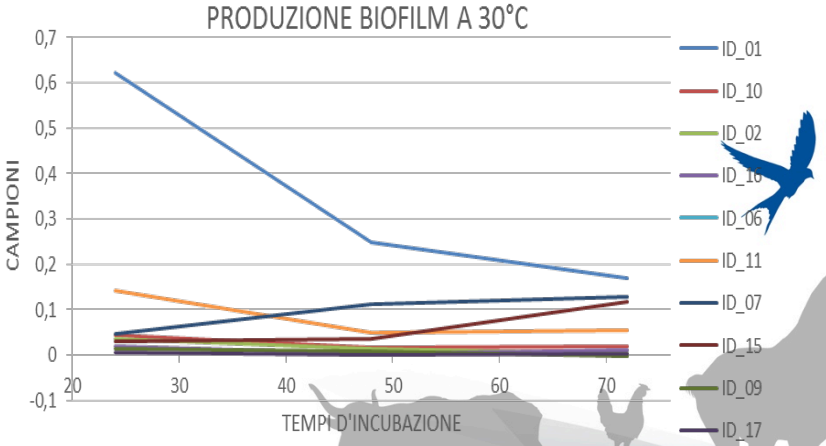


Risultati biofilm con C.V. violetto al 2% a 540nm a 30° C





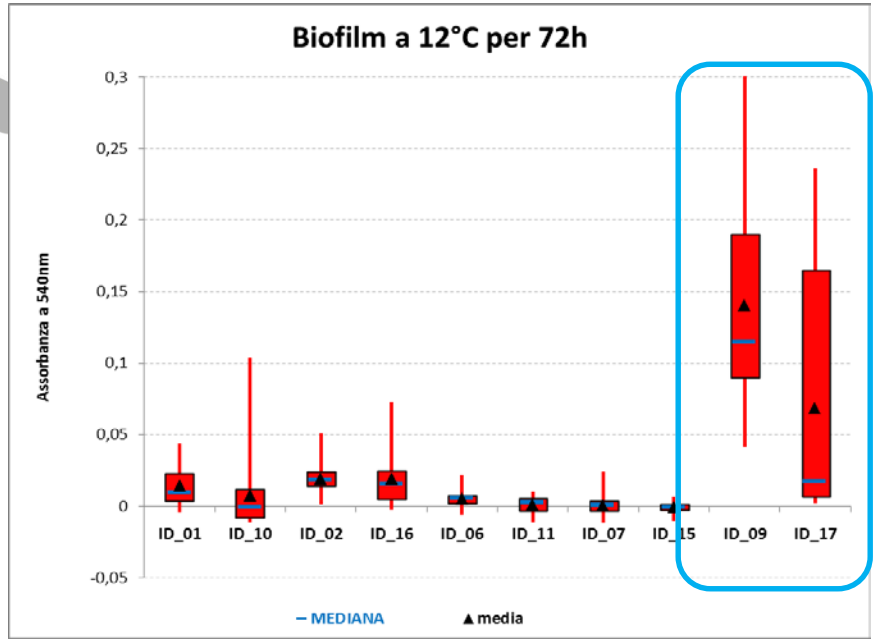


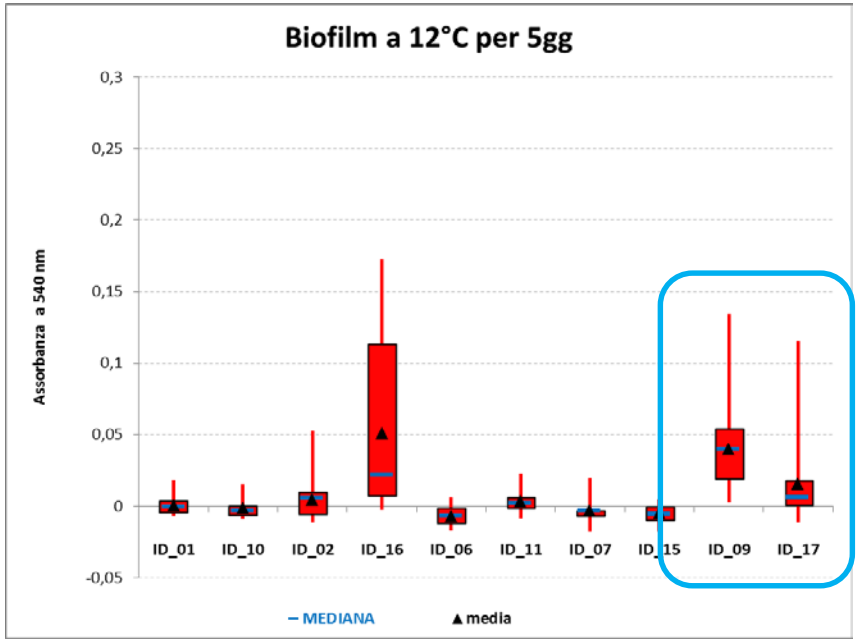


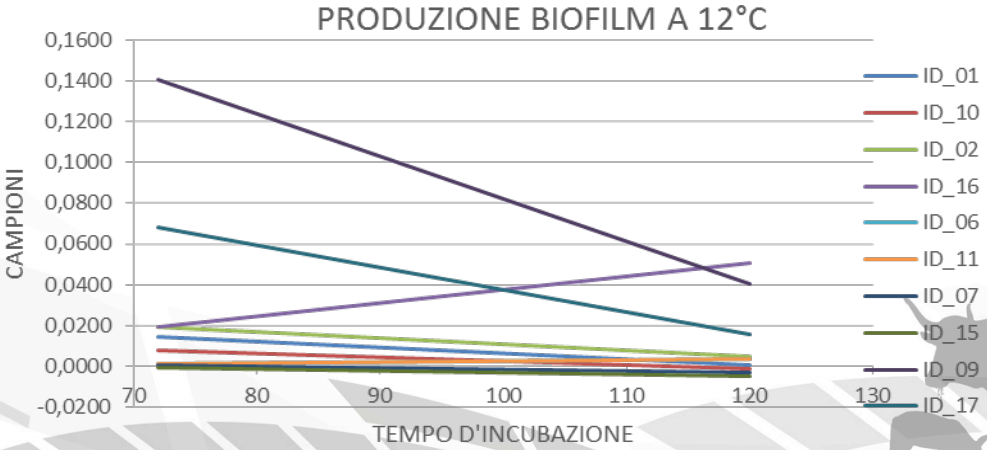
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Risultati biofilm con C.V. violetto al 2% a 540nm a 12° C







Metodo per la determinazione della MIC

- Per ogni ceppo di *L.m* da testare sono state allestite soluzioni di inoculo di circa 0,5-1,5 $*10^6$ ufc/ml pre-adattate alle temperature da testare.
- In ogni pozzetto di una piastra da 96 per colture cellulari è stato dispensato 150 microlitri della suddetta soluzione di inoculo.
- Alle soluzioni di inoculo dispensate sono state addizionate 150 microlitri di diluizioni seriali in base due di benzalconio cloruro (range testato: da 4000ng a 100ng).
- Le piastre così allestite sono state incubate a 30 ° C e a 12° C rispettivamente per 48h e 72h.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Determinazione della MIC

La minima concentrazione inibente (MIC) di benzalconio cloruro su ceppi di *L.m*. è stata determinata come la più bassa concentrazione di disinfettante capace di inibire la crescita di *L.m.* visibile sia ad occhio nudo **(assenza di torbidità)** sia mediante spettrofotometro determinata da un non incremento dei valori di assorbanza **(assorbanza ad una OD600).**

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Risultati della MIC del benzalconio cloruro

La MIC di benzalconio cloruro ottenuta nei confronti dei dieci ceppi di *L.m.* testati è stata identica alle due differenti temperature di incubazione:

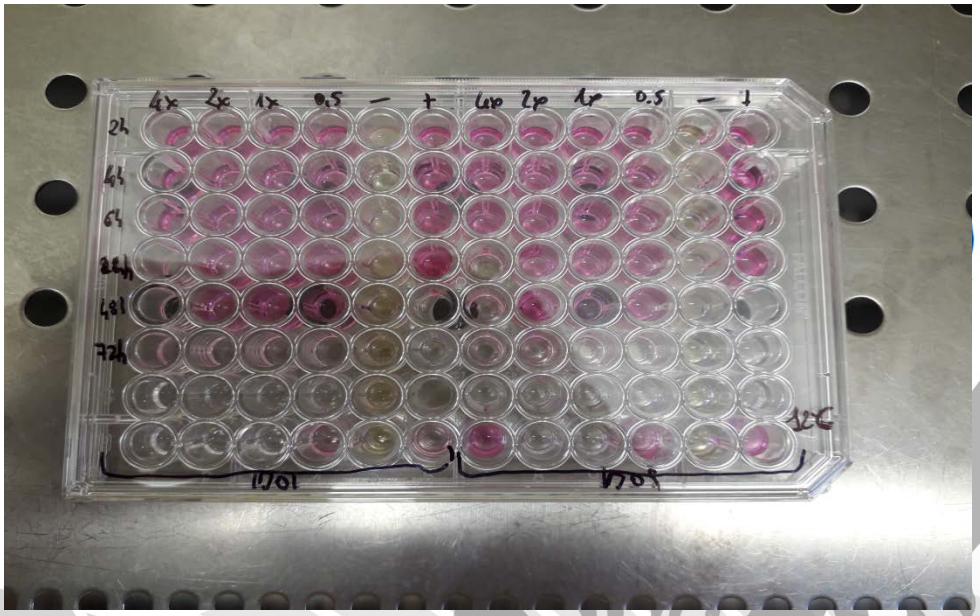
- a 30° C per 48h: 400ng (4ppm/ml)
- a 12° C per 72h: 200ng (2ppm/ml) dopo le 72h la MIC è risultata essere di 4ppm/ml.

Tempo di inattivazione del benzalconio cloruro (BC) *vs L.m.*

La inattivazione del BC sui ceppi di L.m. è stata determinata mediante il metodo della microdiluizione in brodo.

- Le soluzioni di inoculo di 0,5-1,5 $*10^6$ ufc/ml dei due campioni (150 microlitri per pozzetto) sono stati esposti ai valori delle MIC determinate e alle concentrazioni 4X, 2X la MIC per la prova a 30° C e alle concentrazioni di 4X, 2X e 0,5X la MIC per la prova a 12° C.

- Dopo 2h, 4h, 6h, 24h e 48h per i 30° C e dopo 2h, 4h, 6h, 24h, 48h e 72h per i 12° C sono stati prelevati da ciascun pozzetto i surnatanti (fase planctonica) di L.m. e valutati mediante ISO 11290-2.

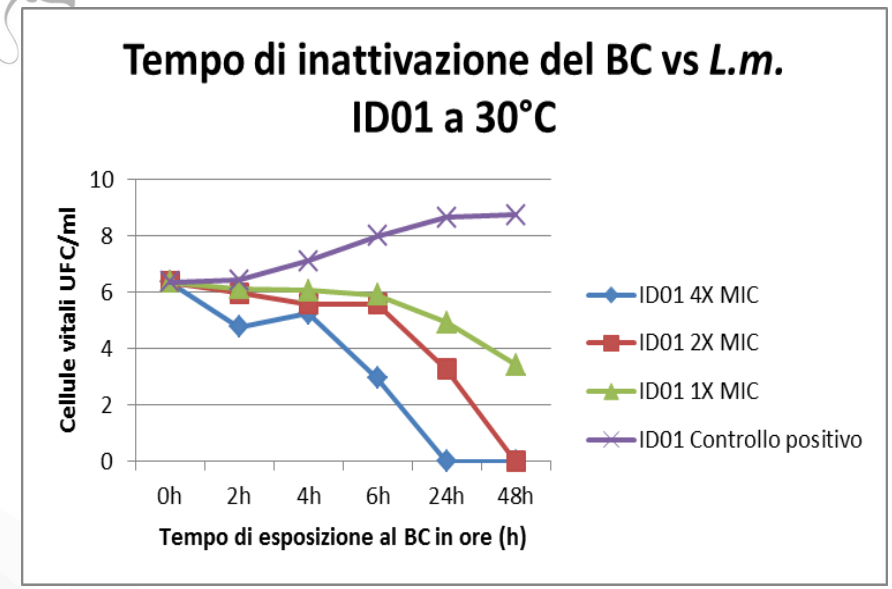


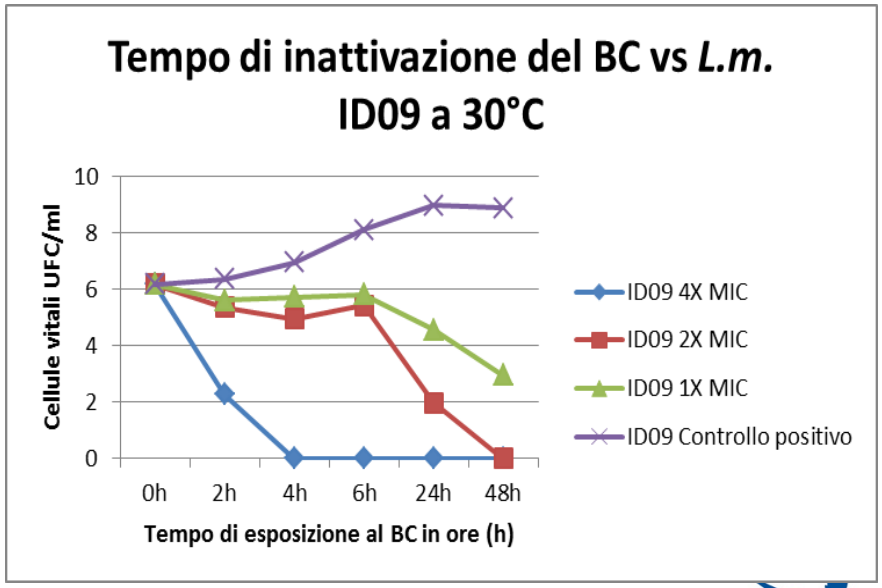
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

RISULTATI

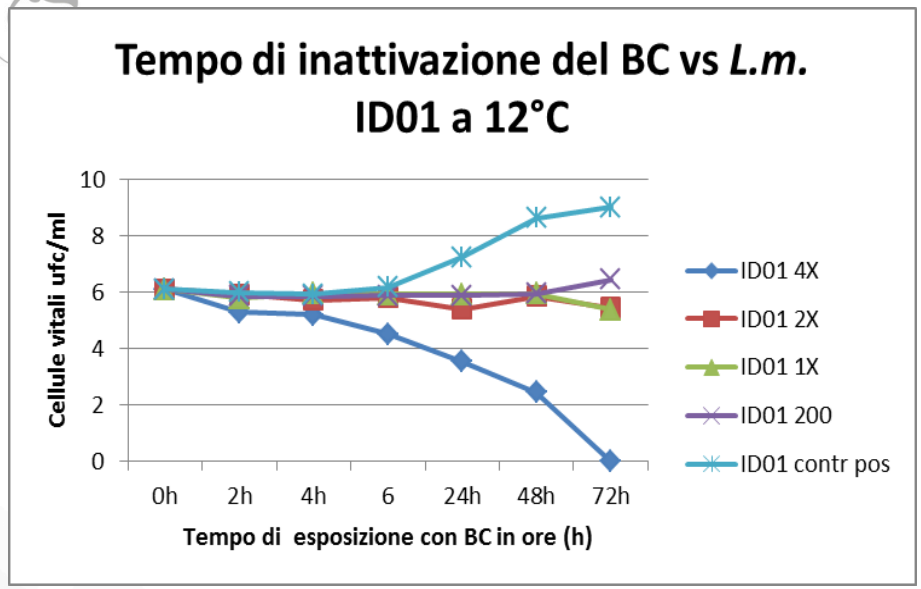
Tempo di inattivazione del benzalconio cloruro *vs* cellule planctoniche di *L.m.* a 30° C per 48h

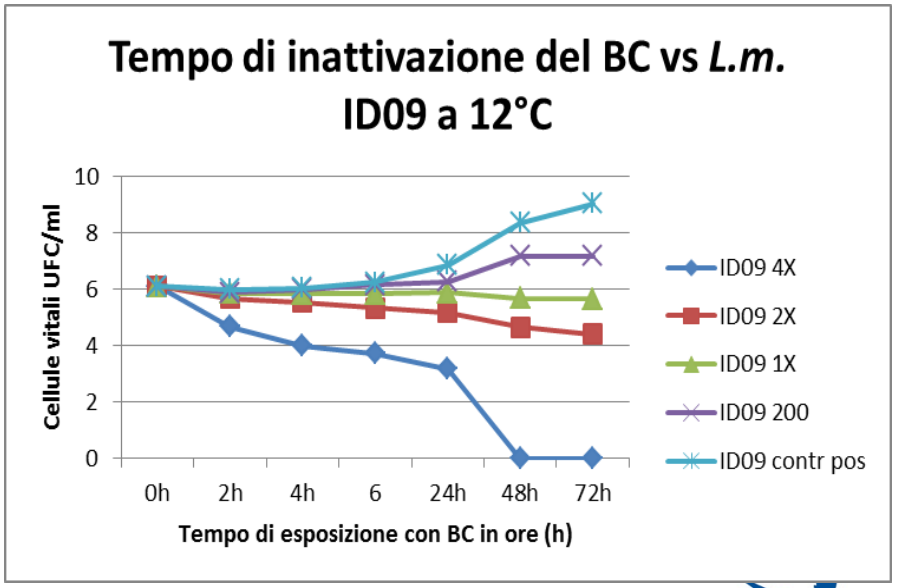




Curva di riduzione delle cellule planctoniche vitali in Log10 ufc/ml *vs* tempo

Tempo di inattivazione del benzalconio cloruro *vs* cellule planctoniche di *L.m.* a 12° C per 72h





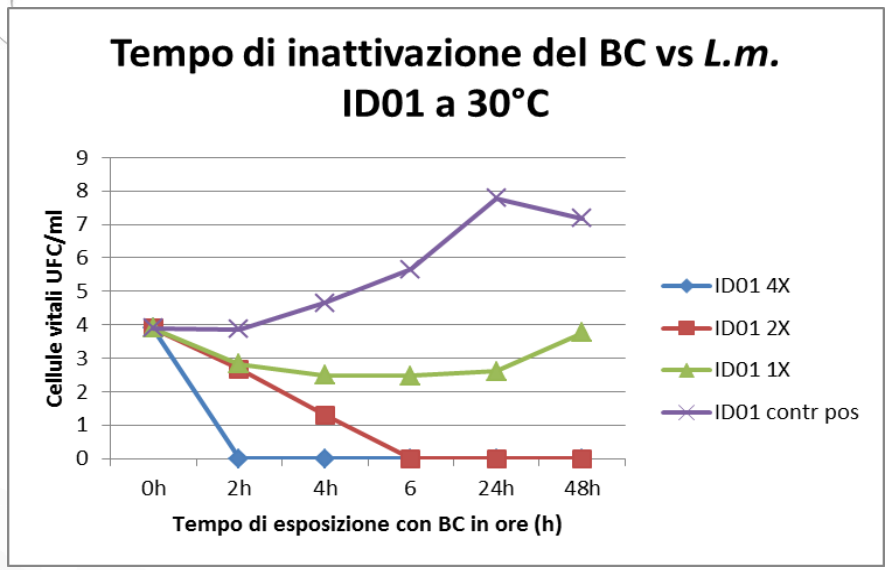
Curva di riduzione delle cellule planctoniche vitali in Log ufc/ml *vs* tempo

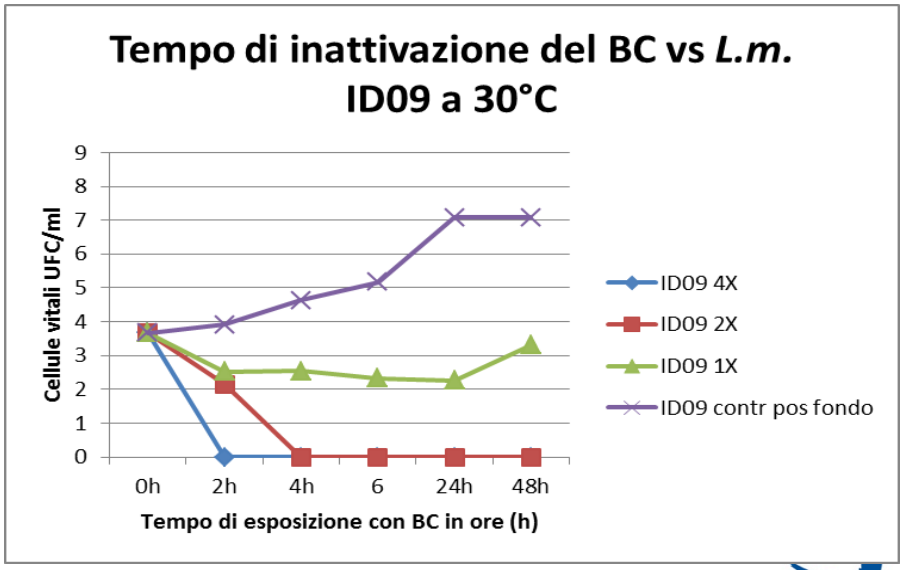
Tempo di inattivazione del benzalconio cloruro su biofilm formato dopo (13h a 30° C)

- In ogni pozzetto di una piastra da 96 per colture cellulari è stato dispensato 150 microlitri della soluzione di inoculo 0,5-1,5*10^2 ufc/ml.
- Le piastre sono state incubate a 30° C for 13h fino al raggiungimento di una concentrazione di circa 0,5-1,5 *10^6 ufc/ml (forma planctonica).
- Al termine di questa incubazione alle soluzioni di inoculo sono stati addizionati 150 microlitri di 1X, 2X e 4X MIC di BC.
- Ad intervalli di tempo di 2, 4, 6, 24h e 48h da ogni pozzetto è stato rimosso il surnatante ed il biofilm formato composto da ~ 10^3 ufc/ml di *L.m.* è stato staccato mediante tripsina. L'azione del BC è stata valutata mediante ISO 11290-2.

RISULTATI

Tempo di inattivazione del benzalconio cloruro *vs* cellule vitali bentoniche a 30° C per 48h





Curva di riduzione cellule bentoniche vitali in Log ufc/ml *vs* tempo

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

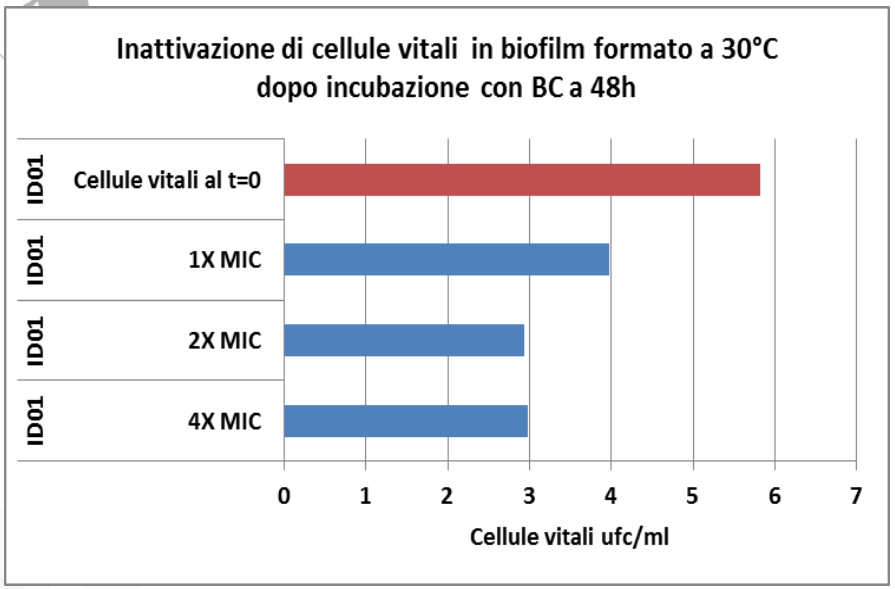
Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

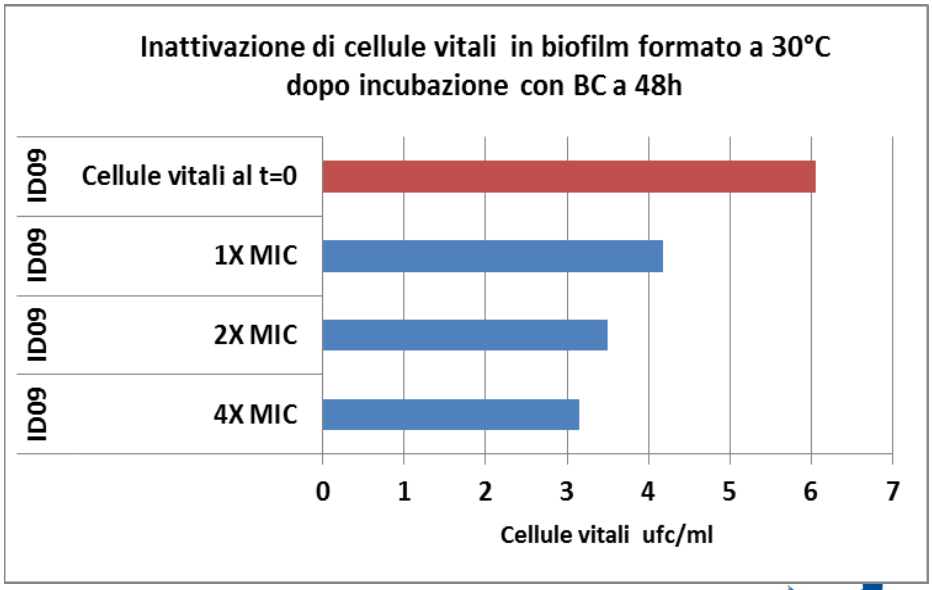
Tempo di inattivazione del BC *vs* biofilm formato (18h a 30° C)

- In ogni pozzetto di una piastra da 96 per colture cellulari è stato dispensato 150 microlitri della soluzione di inoculo 0,5-1,5*10^2 ufc/ml.
- Le piastre sono state incubate a 30° C for 18h fino al raggiungimento di una concentrazione di circa 0,5-1,5 *10^6 ufc/ml (forma bentonica).
- Al termine di questa incubazione le soluzioni di inoculo sono state eliminate, i pozzetti sono stati lavati con PBS 1X x 3 volte è stato valutato il livello di cellule vitali iniziale.
- Sono stati addizionati 150 microlitri di 1X, 2X e 4X MIC di BC.
- Al termine delle 48h da ogni pozzetto è stato rimosso il surnatante, lavato per tre volte in PBS 1X e le cellule componenti il biofilm formato sono state staccate mediante tripsina e valutate mediante ISO 11290-2.

Riduzione delle cellule vitali su biofilm formato a 30° C per 48h

National Reference Laboratory





Riduzione cellule bentoniche vitali in Log ufc/ml *vs* tempo

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

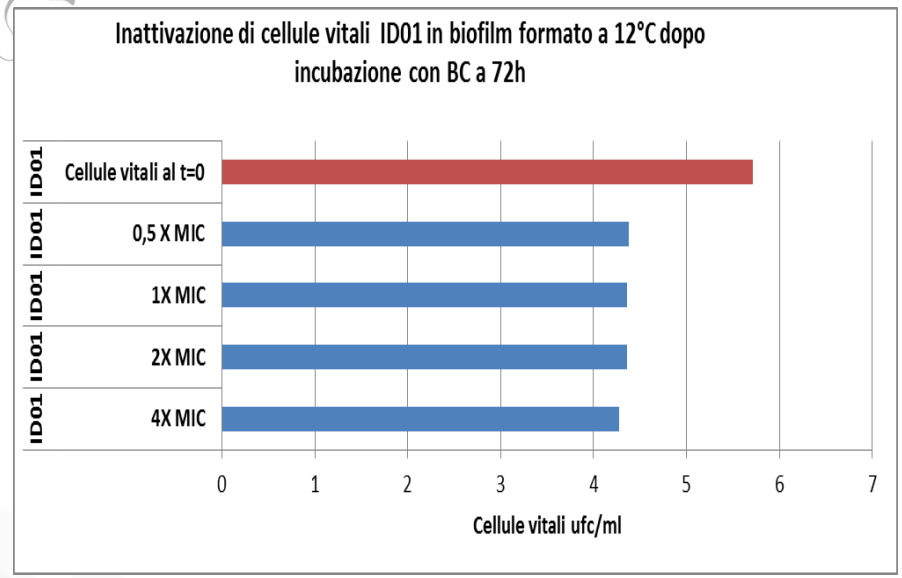
Tempo di inattivazione di Lm con BC *Vs* biofilm formato (72h a 12° C)

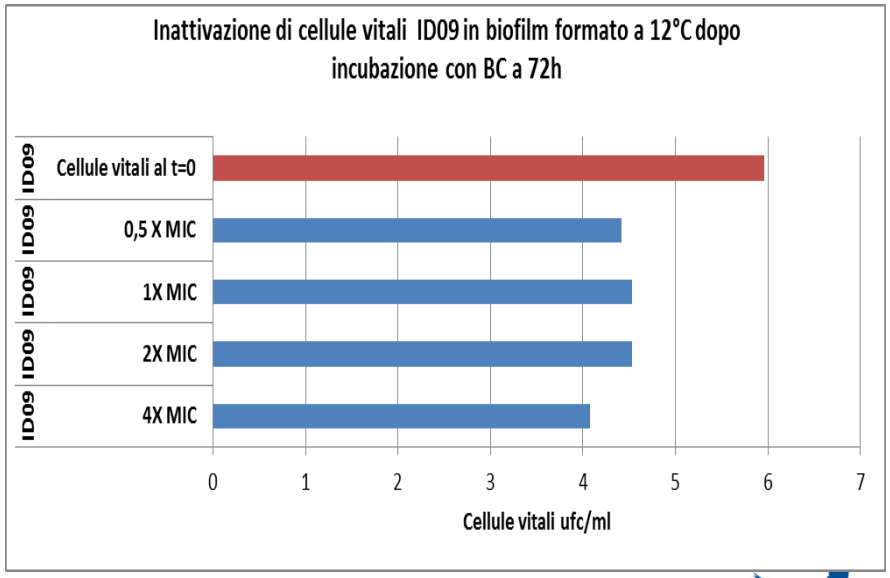
- In ogni pozzetto di una piastra da 96 per colture cellulari è stato dispensato 150 microlitri della soluzione di inoculo 0,5-1,5*10^5 ufc/ml.
- Le piastre sono state incubate a 12° C for 70h fino al raggiungimento di una concentrazione di circa 0,5-1,5 *10^6 ufc/ml (forma bentonica).
- Al termine di questa incubazione le soluzioni di inoculo sono state eliminate, i pozzetti sono stati lavati con PBS 1X x 3 volte è stato valutato il livello di cellule vitali iniziale.
- Sono stati addizionati 150 microlitri di 0,5X 1X, 2X e 4X MIC di BC.
- Al termine delle 72h da ogni pozzetto è stato rimosso il surnatante, lavato per tre volte in PBS 1X e le cellule componenti il biofilm formato sono state staccate mediante tripsina e valutate mediante ISO 11290-2.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Riduzione delle cellule vitali su biofilm formato a 12° C per 72h





Riduzione cellule bentoniche vitali in Log ufc/ml *vs* tempo

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Conclusioni

- La temperatura è un fattore che influenza la formazione di biofilm di *L. monocytogenes.*
- Tutti i ceppi di *L. monocytogenes* sono abili nel produrre biofilm sia a 12 ° C che a 30 ° C.
- 7 ceppi su 10 esaminati producono maggiori quantità a 30° C.
- Due ceppi producono maggiori quantità di biofilm a 12 ° C (ID09, ID17) che non a 30 ° C (probabilmente dovuta all' adattamento, in risposta a condizioni ambientali??)

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Conclusioni

- Il biofilm prodotto dai due ceppi a 12 ° C rappresenta un alto rischio per le industrie alimentari che lavorano a 12° C.

- I 4 ceppi esaminati hanno la stesso valore di MIC alle due temperature testate anche se hanno differenti capacità di produrre biofilm.
- La resistenza al BC e la capacità di produrre biofilm sembra non siano in relazione.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Conclusioni

Questi studi mostrano che la resistenza di *L.m*. bentoniche all'attività di BC è maggiore se comparata con lo stesso quantitativo di cellule in fase planctonica.

- Probabilmente dovuta alla presenza di maggiore biomassa e della componente matrice.

L'attività di BC è influenzata dalla temperatura.

- attività maggiore a 30° C piuttosto che a 12° C sia su cellule in fase bentonica che in fase planctonica.
- Il benzalconio cloruro mostra, per le forme planctoniche, un effetto dose-dipendente
  - 4X MIC provoca una diminuzione di circa 6 logaritmi entro le 24h
  - 1X MIC provoca una diminuzione di circa 3 logaritmi ma non una completa inattivazione.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Cosa faremo

- Altre prove di produzione di biofilm alle differenti temperature e su differenti substrati come teflon ed acciaio.

- Utilizzare altri disinfettanti per comprenderne meglio il connubio *Lm* e biofilm.

- Ricerca di ceppi resitenti alle operazioni di sanificazione
  - Per valutare l'efficacia delle operazioni in sè.
  - Per valutare l'azione battericida del disinfettante.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Listeria monocytogenes National Reference Laboratory

Cosa faremo

Uso della genomica

- Per indagare sui meccanismi molecolari coinvolti nella produzione di biofilm.
- Eseguire studi di trascrittomica e proteomica per verificare cosa accade all'interno del biofilm.
- Analizzare il miocrobiota presente negli impianti di produzione alimentare in modo tale da avere condizioni ambientali/ nutrizionali più vicini al reale per poter valutare la sua influenza sui ceppi.

Ringrazio:
Giulia Impallatore
Florinda Nocito
E la Dott.ssa Annarita D'Angelo

Grazie a tutti per l'attenzione!