



“Valutazione del potenziale di internalizzazione e relativa decontaminazione biologica di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* ed *Escherichia coli* VTEC in *Ocimum basilicum*”

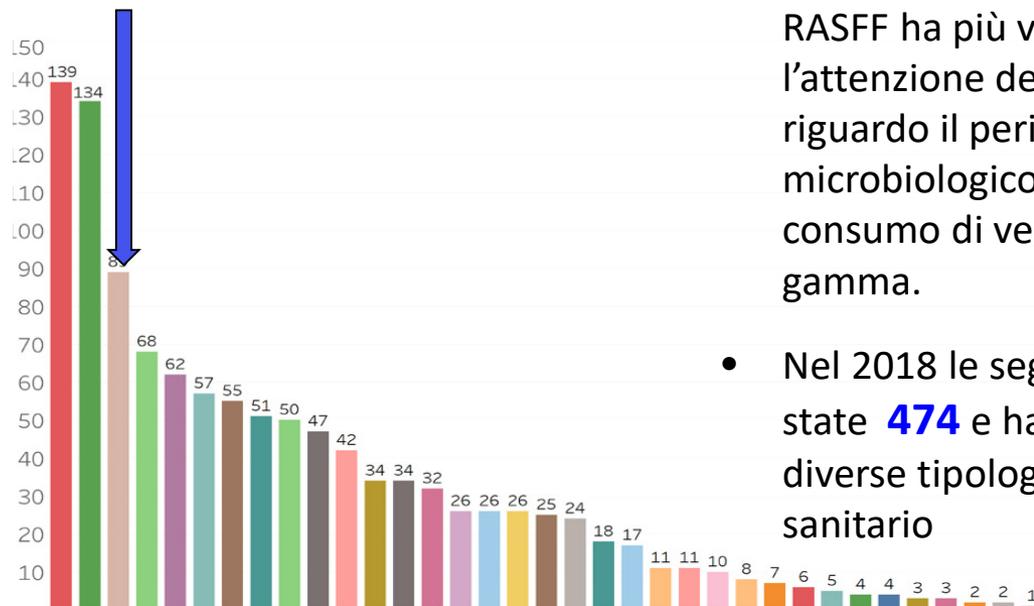


I risultati della ricerca corrente condotta dall’Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’ Abruzzo e del Molise anno 2019

CIFIV, 26.06.2020

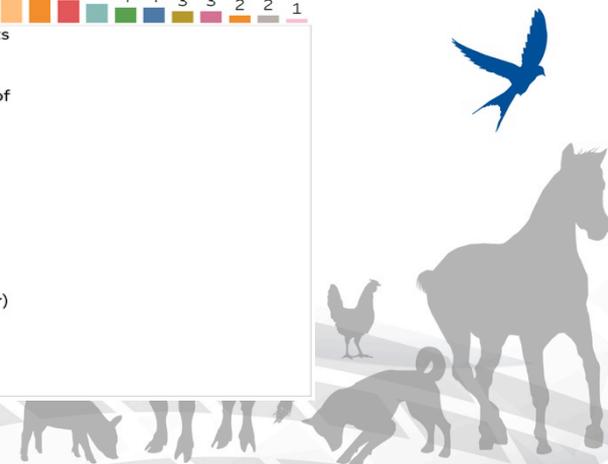
**Relatori
D. D’Angelantonio/F. Pomilio**





- dietetic foods, food supplements, fortified foods
- meat and meat products (other than poultry)
- fruits and vegetables
- cereals and bakery products
- fish and fish products
- other food product / mixed
- food contact materials
- confectionery
- milk and milk products
- fats and oils
- poultry meat and poultry meat products
- cocoa and cocoa preparations, coffee and tea
- prepared dishes and snacks
- feed materials
- food additives and flavourings
- herbs and spices
- non-alcoholic beverages
- compound feeds
- soups, broths, sauces and condiments
- nuts, nut products and seeds
- alcoholic beverages
- bivalve molluscs and products thereof
- eggs and egg products
- wine
- ices and desserts
- honey and royal jelly
- pet food
- crustaceans and products thereof
- cephalopods and products thereof
- gastropods
- natural mineral water
- water for human consumption (other)
- animal by-products
- feed additives
- feed premixtures

- Il sistema di allerta rapido RASFF ha più volte richiamato l'attenzione dei Paesi Membri riguardo il pericolo microbiologico, correlato al consumo di vegetali di IV gamma.
- Nel 2018 le segnalazioni sono state **474** e hanno coinvolto diverse tipologie di rischio sanitario



Obiettivo

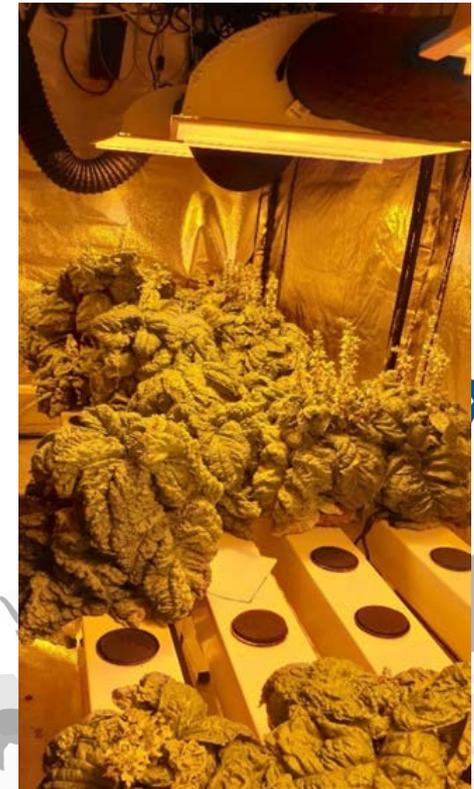
- Le attività sono state svolte al fine di studiare la capacità di **S. Typhimurium**, **L. monocytogenes**, **E. coli VTEC** di internalizzare, attraverso l'apparato radicale, il basilico, alimento di origine vegetale comunemente utilizzato dall'uomo soprattutto crudo.
- In caso di internalizzazione è stata valutata la concentrazione dei microrganismi all'interno delle foglie e del fusto.
- È stata valutata l'efficacia dei **batteriofagi** nei confronti dei microrganismi per la decontaminazione biologica delle piante.
- I batteriofagi consentono di avere uno strumento in più per contrastare il fenomeno dell'AMR batterica



Sistema di coltivazione del basilico: idroponica

Idroponica da «**IDROS**» e «**PONOS**»

- Coltivazione di piante in soluzioni acquose di sali nutritivi o su materiali di esse imbevuti
- Soluzione nutritiva: diluizione in acqua di composti, concentrati minerali/organici



Contaminazione delle piante con brodocultura di *L. monocytogenes*



INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290-1

Second edition 2017-05

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method

Part 1: Detection method

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. — Partie 1: Méthode de recherche

- Allestimento della brodocultura di *L. monocytogenes* ATCC 7644 → concentrazione TO $1,3 \cdot 10^9$ UFC/ml

- La parte aerea edibile è stata isolata mediante l'utilizzo di parafilm allo scopo di evitare contaminazioni superficiali delle foglie e del fusto;
- 10 piante sono state lasciate ad assorbire la brodocultura contenente i microrganismi per 24 ore in immersione;
- La pianta di controllo è stata immersa nello stesso brodo di coltura sterile;
- La presenza e la concentrazione di *L. monocytogenes* è determinata in ciascuna pianta e in foglie e fusto (mediante metodo ISO 11290-1:2017 e 11290-2:2017)

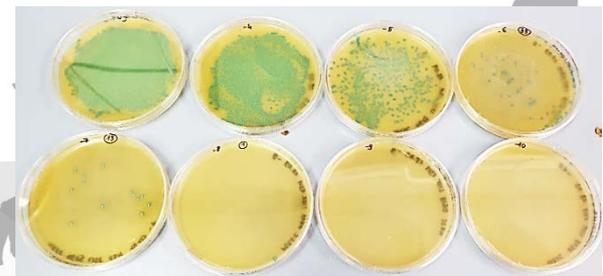
INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290-2

First edition 1998-07-01

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 2: Enumeration method

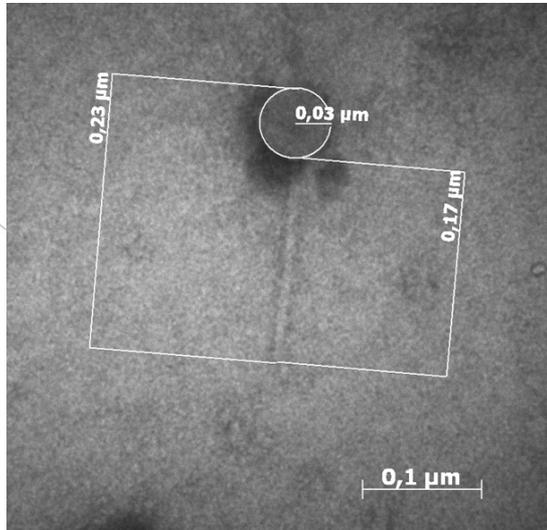
Part 2: Enumeration method

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* — Partie 2: Méthode de dénombrement

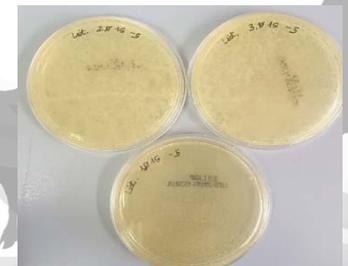


Decontaminazione biologica mediante l'utilizzo di batteriofago IZSAM-1

Ordine: *Caudovirales*, Famiglia: *Siphoviridae*



- Il batteriofago IZSAM-1 attivo nei confronti di *L. monocytogenes*
- Propagazione per il raggiungimento del titolo 10^6 ufp/ml
- Contaminazione delle piante (assorbimento da radici) con brodocultura di *L. monocytogenes* per 24h
- Contatto delle radici delle piante con soluzione decontaminante contenente il batteriofago IZSAM-1 per 24 ore
- Ricerca e numerazione di *L. monocytogenes* in foglie e fusto nei campioni sottoposti a decontaminazione e nel gruppo controllo



Risultati: contaminazione delle piante di basilico con brodocultura di *Listeria monocytogenes*

Numerazione *L. monocytogenes* ISO 11290-2 (2017)

N. campione	Numerazione in FOGLIE (UFC/g)	Numerazione in STELO (UFC/g)	Numerazione tampone
1	20	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10
3	60	< 10	< 10
4	<10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10
7	90	< 10	< 10
8	< 10	11000	< 10
9	>150	> 150	< 10
10	>150	> 150	<10
Controllo Neg	<10	<10	<10

Dalla numerazione è stato possibile osservare che 6/10 piante hanno internalizzato *L. monocytogenes*:

- 2/10 hanno dato esito positivo sia nelle foglie che nello stelo
- 1/10 piante soltanto allo stelo
- 3/10 solo alle foglie.

Ricerca *L. monocytogenes* ISO 11290-1 (2017)

n. campione	RISULTATI RICERCA FOGLIE	RISULTATI RICERCA STELO	RISULTATI RICERCA TAMPONE
1	Presenza	Assenza	Assenza
2	Assenza	Assenza	Assenza
3	Presenza	Assenza	Assenza
4	Presenza	Assenza	Assenza
5	Assenza	Assenza	Assenza
6	Assenza	Assenza	Assenza
7	Presenza	Assenza	Assenza
8	Assenza	Presenza	Assenza
9	Presenza	Presenza	Assenza
10	Presenza	Presenza	Assenza
Controllo Neg	Assenza	Assenza	Assenza

Dalla ricerca è stato possibile confermare che 7/10 piante hanno dato esito positivo all'internalizzazione, in particolare:

- 2/10 hanno dato esito positivo sia nelle foglie che nello stelo
- 1/10 piante soltanto allo stelo
- 4/10 solo alle foglie

Risultati: decontaminazione biologica mediante l'utilizzo di batteriofago IZSAM-1

Non trattate con
il batteriofago



N. campione	Numerazione in foglie (UFC/g)	Numerazione in stelo (UFC/g)	Numerazione tampone
Controllo NEG	< 10	< 10	< 10
Controllo NEG	3600	2400	< 10
Controllo NEG	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10

NESSUNA delle piante sottoposte alla decontaminazione biologica ha dato esito positivo alla presenza di *L. monocytogenes* sia nelle foglie che nello stelo.



Non trattate con
il batteriofago



N. campione	Risultati ricerca foglie	Risultati ricerca stelo	Risultati ricerca tampone
Controllo -	Presenza	Assenza	Assenza
Controllo -	Presenza	Presenza	Assenza
Controllo -	Assenza	Assenza	Assenza
4	Presenza	Assenza	Assenza
5	Assenza	Assenza	Assenza
6	Assenza	Assenza	Assenza
7	Assenza	Assenza	Assenza
8	Assenza	Assenza	Assenza
9	Presenza	Assenza	Assenza

Tra le piante di basilico sottoposte alla decontaminazione con il batteriofago:

- 2/6 piante hanno dato esito positivo alla presenza del patogeno nelle foglie
- Nessuna nello stelo.



Contaminazione delle piante con brodocultura di *E. coli* O157

- Allestimento della brodocultura di **E. coli O157 VTEC EF390**
→ Numerazione T0 **1*10⁹ UFC/ml**
- *E. coli* O157 VTEC EF390, *vtx1* neg, *vtx2* neg, *eae* pos (codificante per l'intimina)
- 10 piante sono state lasciate ad assorbire la brodocultura contenente i microrganismi per 24 ore;
- la pianta di controllo è stata immersa in brodo di coltura sterile
- Ricerca e numerazione del microrganismo internalizzato in foglie e fusto, per ciascuna pianta (con CT SMAC e semina)



Ricerca di *Escherichia coli* VTEC ISO 13136:2013

- La ricerca è stata effettuata in **Real-Time PCR**
- con la quale è possibile amplificare e contemporaneamente misurare la concentrazione di sequenze specifiche di DNA di *E. coli*

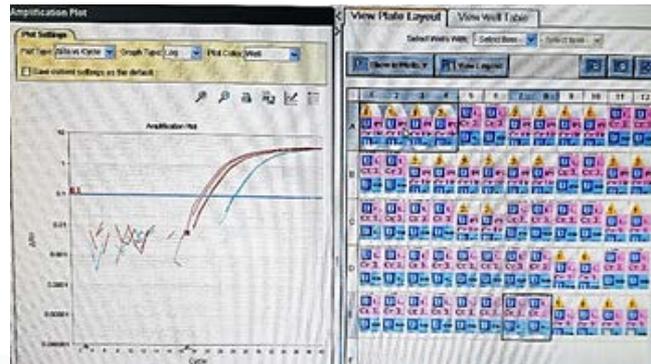
GENE *EAE*

F: 5' - CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA-3'

R: 5' - CTCATGCGGAAATAGCCGTTA-3'

Probe: 5'-FAM- ATAGTCTCGCCAGT ATTCGCCACCAATACC-TAMRA -3'

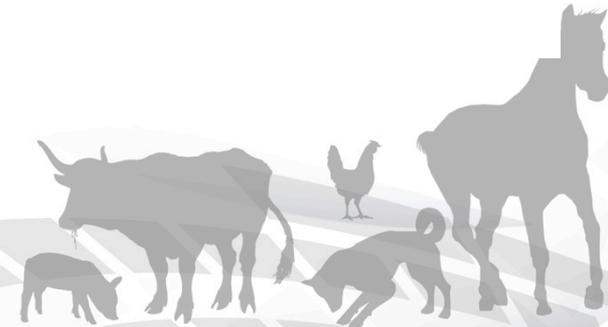
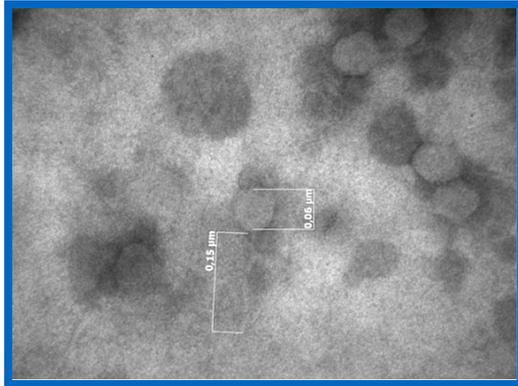
- Per l'allestimento dei controlli si è adoperato, come controllo positivo, il ceppo di riferimento *E. coli* O157 (206 M) o *E. coli* O126 (202 M), entrambi positivi per i geni *eae*, mentre il ceppo di riferimento *E. coli* K 12 (529 M) come controllo negativo



Decontaminazione biologica mediante l'uso di batteriofago 101962_ec 1

Ordine: *Caudovirales*, Famiglia: *Siphoviridae*

- Scelta di batteriofago 101962_ec 1 attivo nei confronti di *E. coli* e propagazione per il raggiungimento del titolo 10^6 UFP/ml;
- Contaminazione delle piante (assorbimento da radici) con brodocultura di *E. coli* per 24h. Trascorse le prime 24h, contatto delle radici delle piante con soluzione di decontaminazione contenente il batteriofago 101962_ec 1;
- Dopo ulteriori 24h, ricerca e numerazione del microrganismo internalizzato in foglie e fusto per ciascuna pianta, sia nei campioni sottoposti a decontaminazione sia nel gruppo controllo.



Risultati: contaminazione delle piante di basilico con brodocultura di *Escherichia coli*

n. campione	Numerazione in foglie (UFC/g)	Numerazione in stelo (UFC/g)	Numerazione tampone
1	< 10	< 10	< 10
2	7000	670.000	< 10
3	< 10	< 10	< 10
4	830	< 10	< 10
5	3100	2300	< 10
6	< 10	1500	< 10
7	2400	2700	< 10
8	420	< 10	< 10
9	< 10	3100	< 10
10	2400	< 10	< 10
Controllo -	< 10	< 10	< 10

Dalla numerazione è stato possibile osservare che 8/10 piante hanno internalizzato *E. coli*

- 3/10 positive sia nelle foglie che nello stelo
- 2/10 positive soltanto allo stelo
- 3/10 solo le foglie.

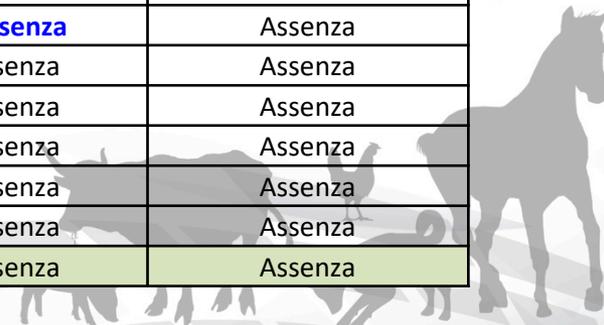


Dalla ricerca è stato possibile confermare che 7/10 piante hanno dato esito positivo all'internalizzazione

- 2/10 hanno dato esito positivo sia nelle foglie che nello stelo
- nessuna pianta soltanto allo stelo
- 5/10 solo alle foglie



n. campione	RISULTATI RICERCA FOGLIE	RISULTATI RICERCA STELO	RISULTATI RICERCA TAMPONE
1	Presenza	Assenza	Assenza
2	Presenza	Presenza	Assenza
3	Assenza	Assenza	Assenza
4	Presenza	Assenza	Assenza
5	Presenza	Presenza	Assenza
6	Assenza	Assenza	Assenza
7	Assenza	Assenza	Assenza
8	Presenza	Assenza	Assenza
9	Presenza	Assenza	Assenza
10	Presenza	Assenza	Assenza
Controllo Neg	Assenza	Assenza	Assenza



Risultati: decontaminazione biologica mediante l'utilizzo di batteriofago 101962_ec 1

Non trattate con il batteriofago →

n. campione	NUMERAZIONE in FOGLIE (UFC/g)	NUMERAZIONE in STELO (UFC/g)	ENUMERAZIONE TAMPONE
Controllo -	< 10	< 10	< 10
Controllo -	< 10	1800	< 10
Controllo -	< 10	2100	< 10
4	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10

→ **NESSUNA** delle piante sottoposte alla decontaminazione biologica ha dato esito positivo alla presenza di *E. coli* sia nelle foglie che nello stelo.

Non trattate con il batteriofago →

n. campione	RISULTATI RICERCA FOGLIE	RISULTATI RICERCA STELO	RISULTATI RICERCA TAMPONE
Controllo -	Assenza	Assenza	Assenza
Controllo -	Assenza	Presenza	Assenza
Controllo -	Assenza	Presenza	Assenza
4	Assenza	Assenza	Assenza
5	Assenza	Presenza	Assenza
6	Presenza	Presenza	Assenza
7	Assenza	Assenza	Assenza
8	Assenza	Presenza	Assenza
9	Presenza	Assenza	Assenza

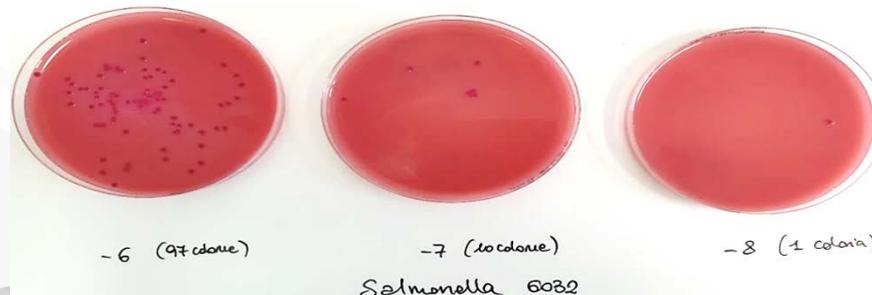
Tra le piante di basilico sottoposte alla decontaminazione con il batteriofago:

- 1/6 piante in foglie e stelo
- 2/6 piante positive nello stelo
- 1/6 solo nelle foglie.

Contaminazione delle piante con brodocultura di *S. Typhimurium*

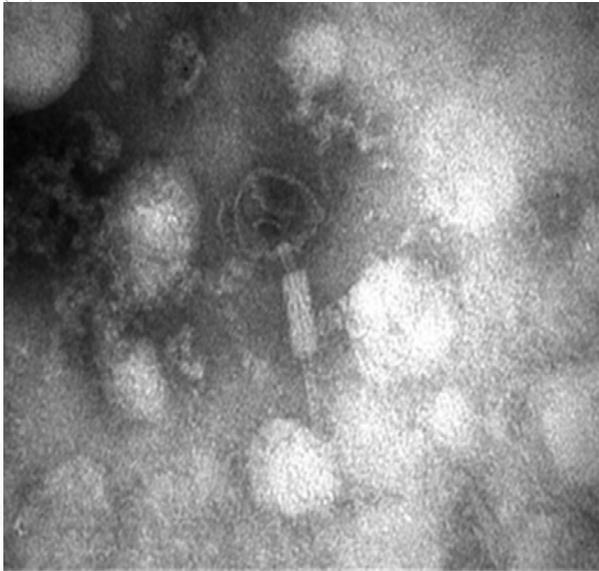


- Allestimento della brodocultura di *S. Typhimurium* → Numerazione a T0 $1,3 \cdot 10^9$ UFC/ml;
- ceppo isolato da acque superficiali del fiume Aterno presso il Comune di Molina Aterno (AQ). Il microrganismo è stato scelto per la resistenza nei confronti di ampicillina, gentamicina, sulfametossazolo e tetraciclina;
- 10 piante sono state lasciate ad assorbire la brodocultura contenente i microrganismi per le successive 24 ore;
- la restante pianta di controllo è stata immersa nel brodo di coltura sterile;
- Ricerca e numerazione di Salmonella in foglie e fusto di ciascuna

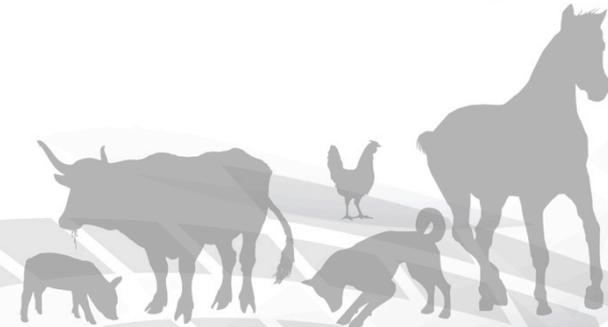


Decontaminazione biologica mediante l'uso di batteriofago Sal_64795

Ordine: *Caudovirales*, Famiglia: *Myoviridae*



- Scelta di batteriofago Sal_64795 attivo nei confronti di *Salmonella* e propagazione per il raggiungimento del titolo 10^6 ;
- Contaminazione delle piante (assorbimento da radici) con brodocultura di *S. Typhimurium* per 24h
- Trascorse le prime 24h, contatto delle radici delle piante con soluzione di decontaminazione contenente il batteriofago Sal_64795
- Dopo ulteriori 24h, ricerca e numerazione di salmonella (Rambach agar e XLD agar) in foglie e fusto per ciascuna pianta sia nei campioni sottoposti a decontaminazione sia nel gruppo controllo



Risultati: contaminazione delle piante di basilico con brodocultura di *Salmonella*

N.CAMPIONE	NUMERAZIONE in FOGLIE (UFC/g)	NUMERAZIONE in STELO (UFC/g)	NUMERAZIONE TAMPONE
1	< 10	10.000	< 10
2	660	<10	< 10
3	< 10	<10	< 10
4	< 10	<10	< 10
5	18.000	15.000	< 10
6	73000	5000	< 10
7	< 10	< 10	< 10
8	< 10	1400	< 10
9	73.000	2400	< 10
10	< 10	< 10	< 10
Controllo -	< 10	<10	< 10

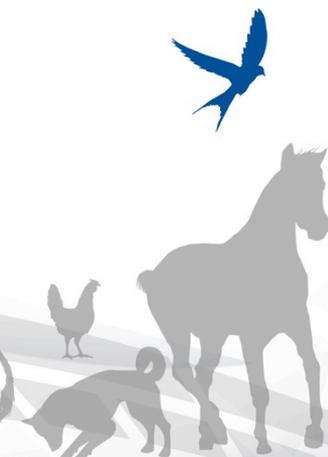
Dalla numerazione è stato possibile osservare che 6/10 piante hanno dato esito positivo all'internalizzazione di *Salmonella*:

- 3/10 hanno dato esito positivo sia nelle foglie che nello stelo
- 2/10 piante soltanto allo stelo
- 1/10 solo alle foglie.

Dalla ricerca è stato possibile confermare che 10/10 piante hanno dato esito positivo all'internalizzazione, in particolare:

- 10/10 hanno dato esito positivo sia nelle foglie
- 6/10 anche nei fusti

n. campione	RISULTATI RICERCA FOGLIE	RISULTATI RICERCA STELO	RISULTATI RICERCA TAMPONE
1	Presenza	Presenza	Assenza
2	Presenza	Assenza	Assenza
3	Presenza	Assenza	Assenza
4	Presenza	Assenza	Assenza
5	Presenza	Presenza	Assenza
6	Presenza	Presenza	Assenza
7	Presenza	Presenza	Assenza
8	Presenza	Presenza	Assenza
9	Presenza	Presenza	Assenza
10	Presenza	Assenza	Assenza
Controllo -	Assenza	Assenza	Assenza



Risultati: decontaminazione biologica mediante l'utilizzo di batteriofago Sal_64795

Non trattate con il batteriofago

n. campione	NUMERAZIONE in FOGLIE (diluizione conta) (UFC/g)	NUMERAZIONE in STELO (diluizione conta) (UFC/g)	NUMERAZIONE TAMPONE (UFC/g)
Controllo NEG	8.1*10 ⁵	< 10	< 10
Controllo NEG	1.1*10 ⁶	< 10	< 10
Controllo NEG	9.7*10 ⁴	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10
6	< 10	7.1*10	< 10
7	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10
9	< 10	2.1*10 ²	< 10

Dalla numerazione è stato possibile osservare che soltanto 2/6 delle piante sottoposte alla decontaminazione biologica ha dato esito positivo alla presenza di colonie di *Salmonella* numerabili nello stelo.

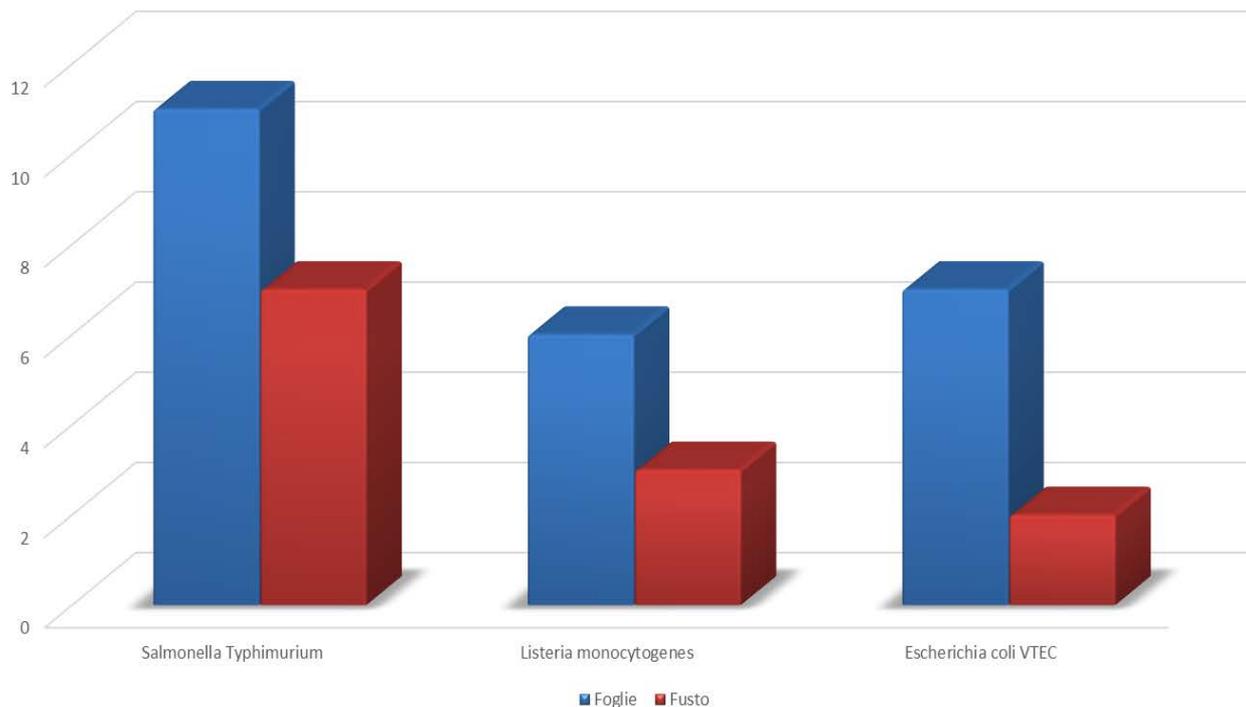
Non trattate con il batteriofago

n. campione	RISULTATI RICERCA FOGLIE	RISULTATI RICERCA STELO	RISULTATI RICERCA TAMPONE
Controllo -	Presenza	Presenza	Assenza
Controllo -	Presenza	Presenza	Assenza
Controllo -	Presenza	Assenza	Assenza
4	Presenza	Presenza	Assenza
5	Presenza	Presenza	Assenza
6	Assenza	Presenza	Assenza
7	Assenza	Presenza	Assenza
8	Presenza	Presenza	Assenza
9	Assenza	Presenza	Assenza

Tra le piante di basilico sottoposte alla decontaminazione con il batteriofago:

- 6/6 piante hanno dato esito positivo alla presenza del patogeno nello stelo
- 3/6 anche nelle foglie.

RICERCA DEI MICRORGANISMI PATOGENI

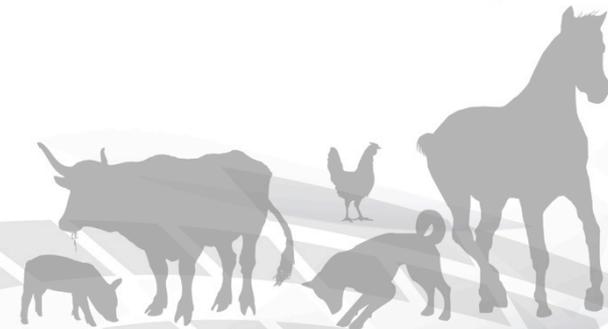


S. Typhimurium presenta una maggiore capacità di internalizzare all'interno delle piante di basilico, rispetto ad *Escherichia coli* VTEC e a *L. monocytogenes*.



Take home message

- Le segnalazioni relative al consumo di verdure fresche a foglia come causa di malattie a trasmissione alimentare sono sempre più frequenti.
- L'internalizzazione di diversi microrganismi patogeni all'interno del tessuto vegetale attraverso le radici è stato già dimostrato, e i dati del nostro studio lo confermano
- L'internalizzazione rende inutile il solo lavaggio e disinfezione esterni
- L'internalizzazione è stata dimostrata anche nel corso del nostro studio, il cui scopo era anche di dimostrare l'attività antibatterica dei batteriofagi.



Take home message – Batteriofagi

Abbiamo trattato le piante con i batteriofagi e i risultati ottenuti hanno mostrato la capacità dei fagi **IZSAM-1 101962_ec 1** e **Sal_64795** di ridurre di **3 logaritmi** la concentrazione dei microrganismi internalizzati.

- I batteriofagi sono specie specifici nei confronti dei batteri.
- L'impiego dei fagi non è ancora autorizzato in UE; l'EFSA raccomanda studi al fine di dimostrarne ulteriormente l'efficacia e l'innocuità per l'uomo, ai fini di migliorare la sicurezza per il consumatore.
- I batteriofagi potrebbero essere utilizzati come bio-decontaminanti innovativi in quanto sono in grado di ridurre le cariche dei batteri AMR



Grazie per l'attenzione

