

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

PROGETTO RUMINA (RC05/18):

Challenge test con *Campylobacter jejuni* in latte e prodotti lattiero-caseari

Alice Marchegiano
Igiene e Tecnologie degli Alimenti

A large food-borne outbreak of campylobacteriosis in kindergartens and primary schools in Pescara, Italy, May-June 2018

Simona Sorgentone ¹, Luca Busani ², Paolo Calistri ³, Giorgio Robuffo ¹, Stefania Bellino ², Vicdalia Acciari ³, Maurizio Ferri ¹, Caterina Graziani ^{4 2}, Salvatore Antoci ³, Fabrizio Lodi ¹, Valeria Alfonsi ^{5 2}, Cesare Cammà ³, Paolo Fazii ⁶, Xanthi Andrianou ², Francesca Cito ³, Giuliano Lombardi ⁶, Gabriella Centorotola ³, Massimo D'Amario ¹, Nicola D'Alterio ³, Vincenzo Savini ⁶, Fabrizio De Massis ³, Anna Pelatti ⁶, Marco Di Domenico ³, Guido Di Donato ³, Elisabetta Di Giannatale ³, Lisa Di Marcantonio ³, Violeta Di Marzio ³, Gabriella Di Serafino ³, Anna Janowicz ³, Cristina Marfoggia ³, Francesca Marotta ³, Daniela Morelli ³, Giacomo Migliorati ³, Diana Neri ³, Francesco Pomilio ³, Silvia Scattolini ³, Giovanni Rezza ^{7 2}, Antonio Caponetti ¹, Patrizio Pezzotti ², Giuliano Garofolo ³

Affiliations + expand

PMID: 33475480 DOI: 10.1099/jmm.0.001262

PRESENTAZIONE LAVORO

- Definizione di **CHALLENGE TEST (CT)**:
 - Studio della crescita o inattivazione di microrganismi inoculati artificialmente negli alimenti
- Obiettivo dei CT:
 - studiare il **potenziale di crescita o la cinetica di crescita** al fine di valutare la durata di conservazione degli alimenti come misura di controllo o la **stabilità microbica** di un alimento fornendo informazioni sul comportamento dei microrganismi (crescita, sopravvivenza o diminuzione) quando inoculati artificialmente
 - ➔ **L'alimento supporta la crescita di un microrganismo inoculato?**
- Perché effettuare un CT per Campylobacter?



IZS

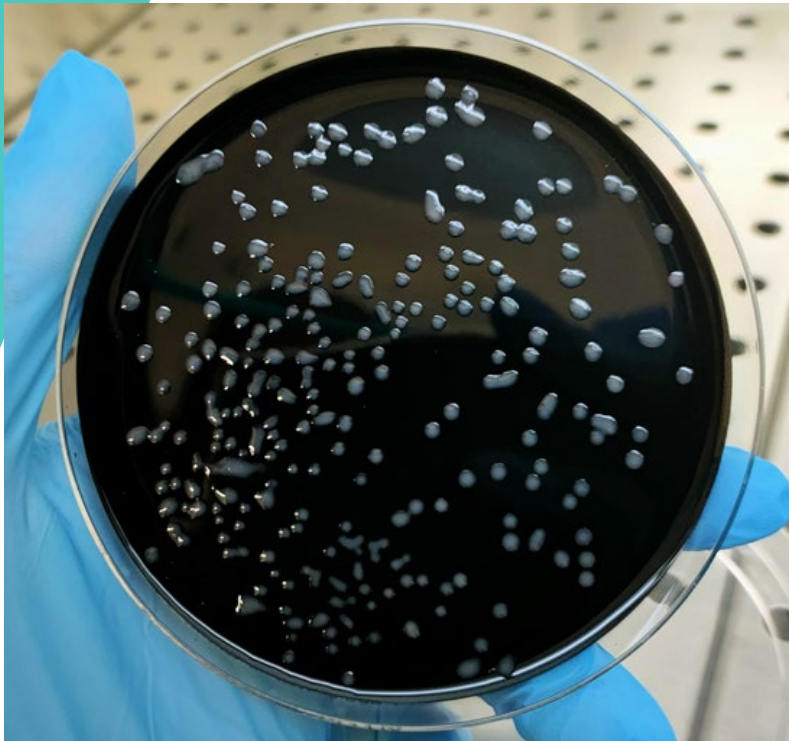
T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

SCOPO DEL LAVORO

- Valutare:
 - Crescita?
 - Inattivazione/sopravvivenza?
- Durata studio: Giugno – Settembre 2021
- Reparto di Igiene e Tecnologie degli Alimenti (Teramo)



**Microbiology of the food chain —
Requirements and guidelines for
conducting challenge tests of food and
feed products —**

Part 1:
**Challenge tests to study growth
potential, lag time and maximum
growth rate**

- ISO 20976-1:2019 Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products
- EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes* (Version 4 of 1 July 2021) - ANSES



EURL Lm
European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes
<http://eurl-listeria.anses.fr>

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT
on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life
of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes*

Bruker MALDI Biotyper Identification Results



Run Info:

Run Identifier: 210806-1101-1011026561
 Comment:
 Operator: tof-user@MBT-WIN10
 Run Creation Date/Time: 2021-08-06T11:33:39.229
 Number of Tests: 24
 Type: Standard
 BTS-QC: not present
 BTS-QC Position:
 Instrument ID: 8604832.05374
 Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
A4 (+) (A)	T1/2 4°C (Standard)	Campylobacter jejuni	1.99	Campylobacter jejuni	1.95
A5 (+++)(A)	T1/2 4°C (Standard)	Campylobacter jejuni	2.18	Campylobacter jejuni	2.08
A6 (+++)(A)	T1/2 4°C (Standard)	Campylobacter jejuni	2.09	Campylobacter jejuni	1.96
A7 (+++)(A)	T1/2 4°C (Standard)	Campylobacter jejuni	2.03	Campylobacter jejuni	2.02
A8 (+++)(A)	T1/2 4°C (Standard)	Campylobacter jejuni	2.27	Campylobacter jejuni	2.16
A9 (+++)(A)	T1/2 7°C (Standard)	Campylobacter jejuni	2.02	Campylobacter jejuni	1.88
A10 (+++)(A)	T1/2 7°C (Standard)	Campylobacter jejuni	2.15	Campylobacter jejuni	2.10

Result overview table—continued on next page

- Ricerca *Campylobacter jejuni* (ISO 10272-1:2017)
- Numerazione *Campylobacter jejuni* (ISO 10272-2:2017)
- pH (MFHPB 03 July 2014)
- aW (ISO 18787:2017)
- Numerazione lattobacilli a 30°C (ISO 15214:1998)
- Maldi-TOF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight”)

MATERIALI

- Alimenti utilizzati → prodotti pronti al consumo (c.d. ready-to-eat):
 - 1 CT su caciotte di un giorno dopo salatura, conservate a 14°C
 - 2 CT su ricotte, conservate a 4°C e a 7°C
 - 1 CT su latte intero pastorizzato, conservato a 4°C e 7°C
- Ceppo utilizzato: *Campylobacter jejuni* M1 (Laboratory designation 99/308)

Genomic Characterization of *Campylobacter jejuni* Strain M1

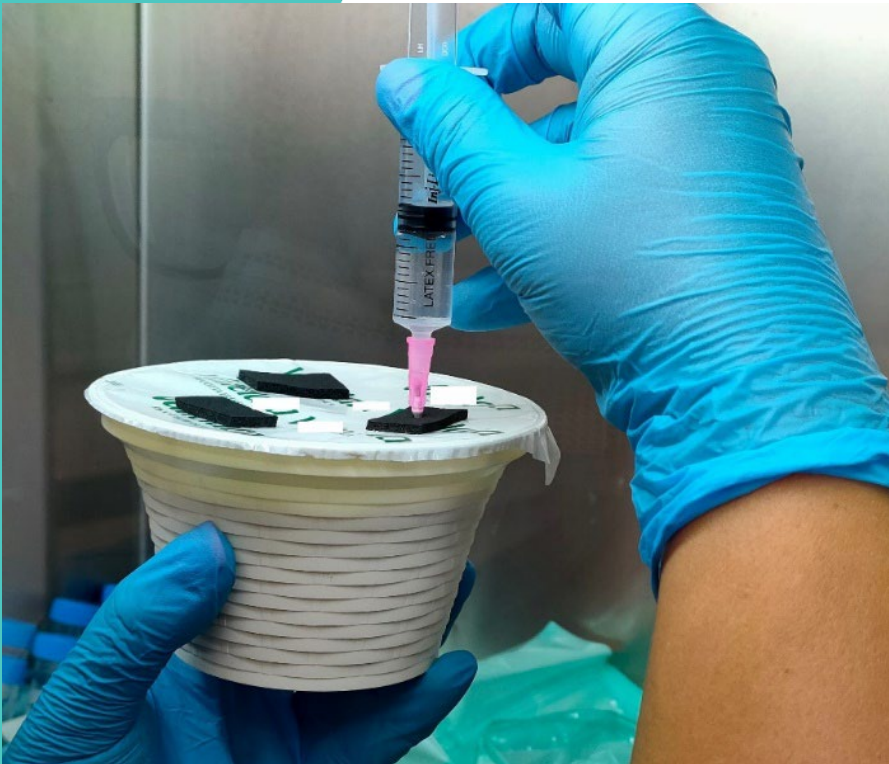
Carsten Friis^{1*}, Trudy M. Wassenaar^{1,2}, Muhammad A. Javed³, Lars Snipen^{1,4}, Karin Lagesen^{1,5,6}, Peter F. Hallin¹, Diane G. Newell^{7,8}, Monique Toszeghy⁷, Anne Ridley⁷, Georgina Manning³, David W. Ussery¹

¹ Department of Systems Biology, The Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark, ² Molecular Microbiology and Genomics Consultants, Zotzenheim, Germany, ³ School of Science and Technology, Nottingham Trent University, Nottingham, United Kingdom, ⁴ Department of Chemistry, Biotechnology and Food Sciences, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway, ⁵ Institute of Medical Microbiology, Oslo University Hospital, Oslo, Norway, ⁶ Department of Informatics, University of Oslo, Oslo, Norway, ⁷ Veterinary Laboratories Agencies, Addlestone, United Kingdom, ⁸ Food-borne Zoonoses Consultancy, Andover, United Kingdom

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



Preparazione inoculo e contaminazione alimenti

- *C. jejuni* M1 (microbank) su Columbia agar 42°C x 24h in microaerofilia
- Colonie in brodo BHI (OD600=0,5) e numerazione in mCCD agar
- Inoculo OD600=0,5 in 100ml BHI poi incubazione 37°C x 16h in agitazione e in microaerofilia
- Dopo 16h numerazione in mCCD agar
- Centrifugazione e concentrazione (75%) e numerazione in mCCD agar dell'inoculo (*)
- Volume di inoculo:massa (o V) campione $\leq 1\%$

IZS

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

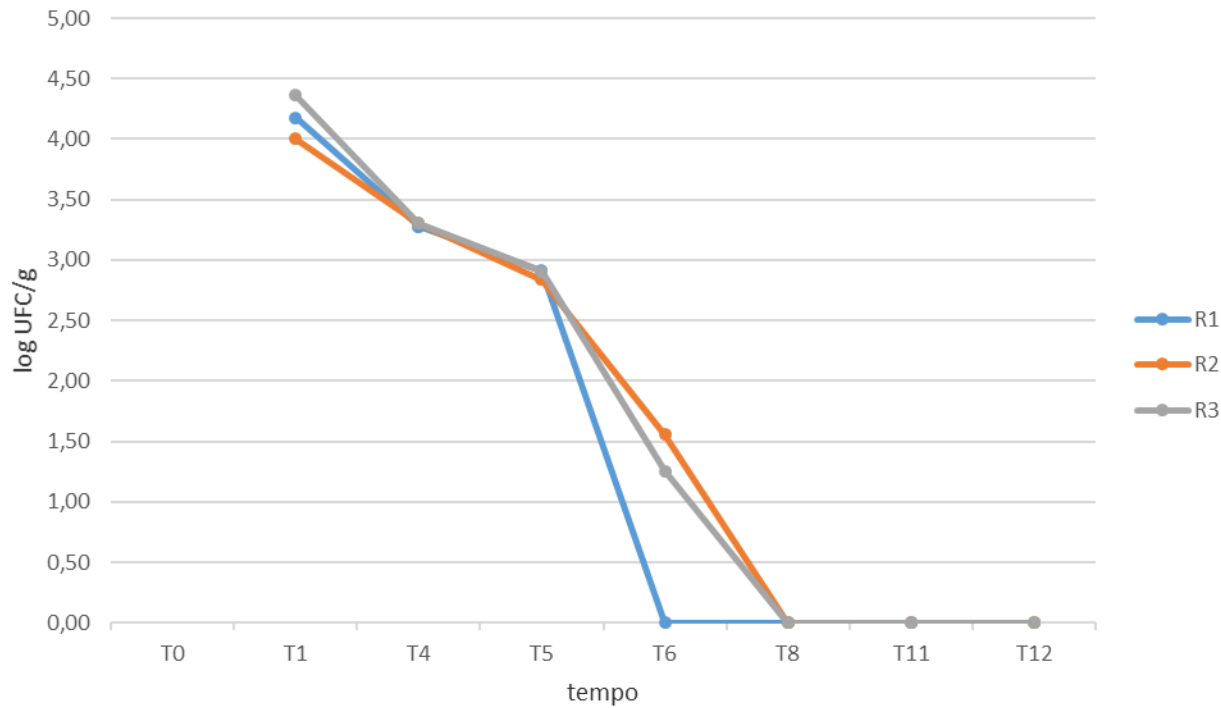
CONTROLLI NEGATIVI (K-) CACIOTTA

tempo	RICERCA C. jejuni in 10g	LATTOBACILLI UFC/g	pH	aW
T0	Assente	25.000.000	5,30	0,97
T8	Assente	38.000.000	5,20	0,96

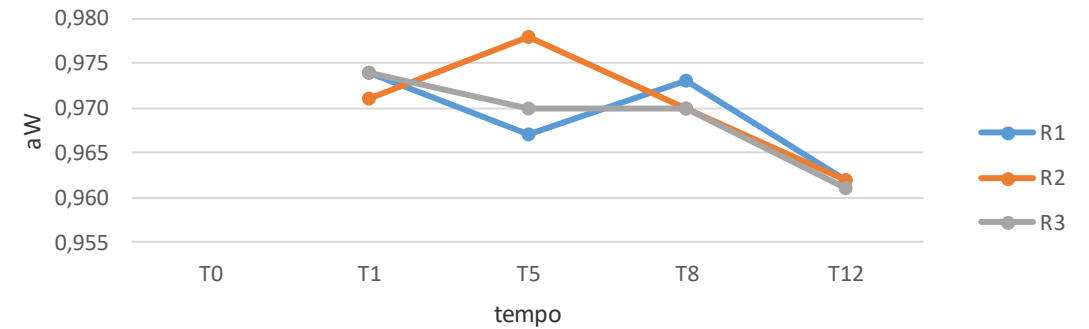
- V max = 8ml
- Inoculo → $7,5 \cdot 10^8$ UFC/ml (8.87 log)

RISULTATI CACIOTTA a 14°C

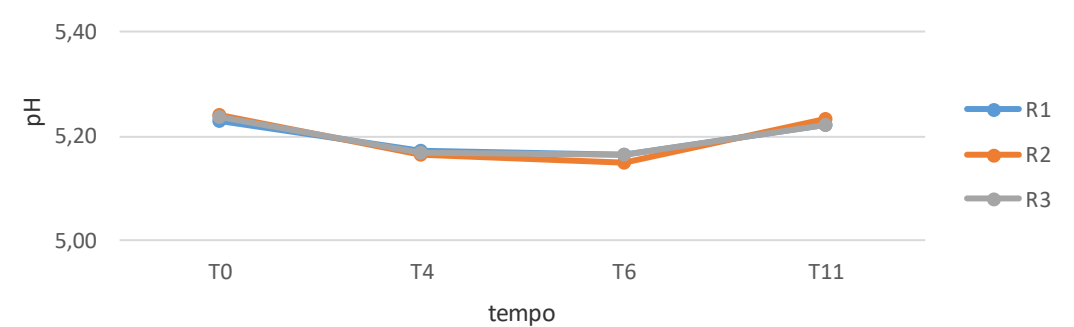
Curva di inattivazione Campylobacter (caciotta)



aW (caciotta)



pH (caciotta)



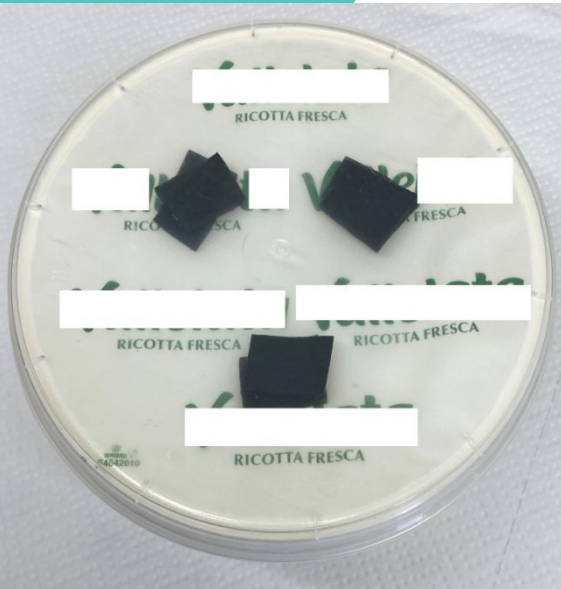
CONTROLLI NEGATIVI (K-) RICOTTA

- Prodotta da un caseificio locale (CT1)

Tempo	RICERCA C. jejuni in 10g	LATTOBACILLI UFC/g	pH	aW
T0	Assente	43	6,62	0,99
T13	Assente	560.000	6,44	0,99

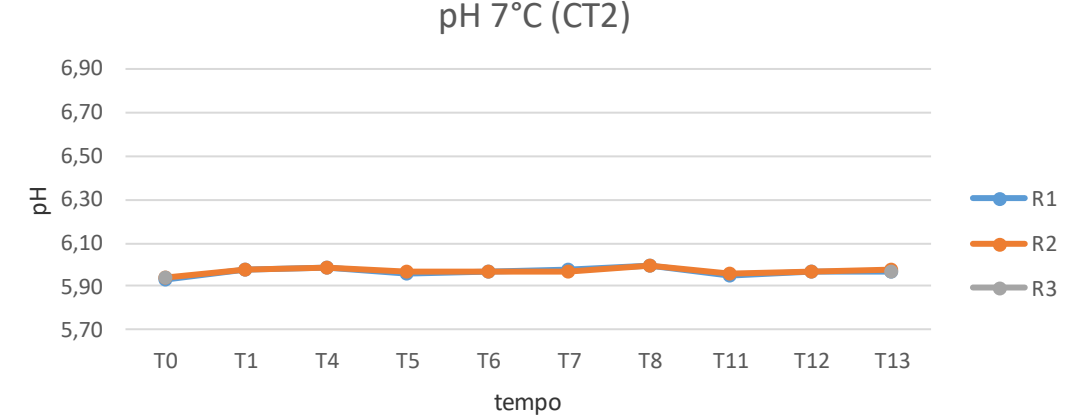
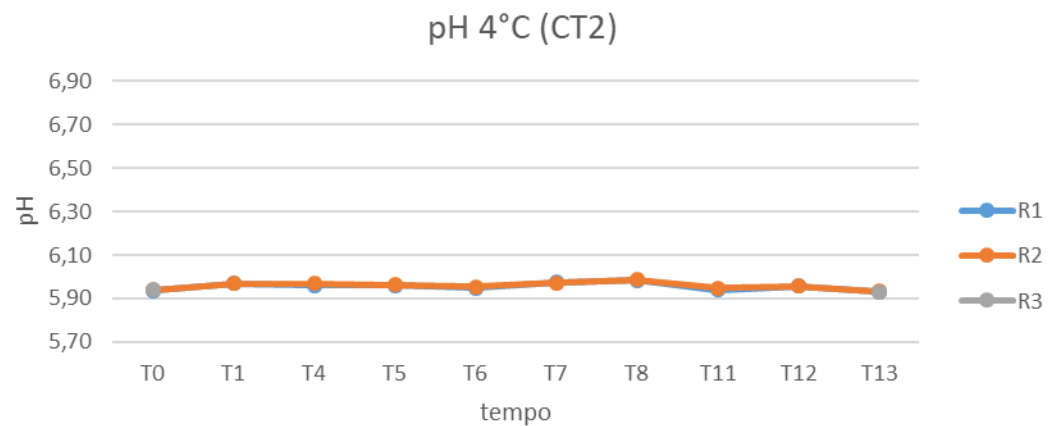
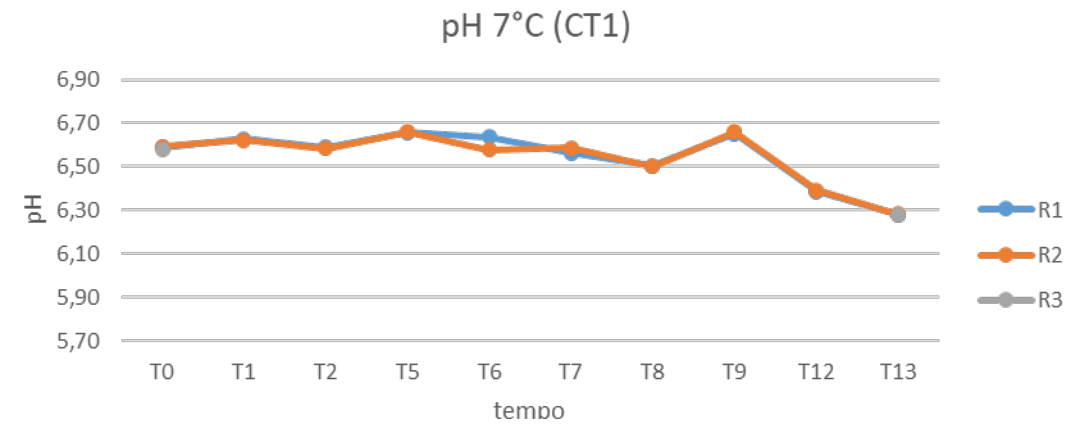
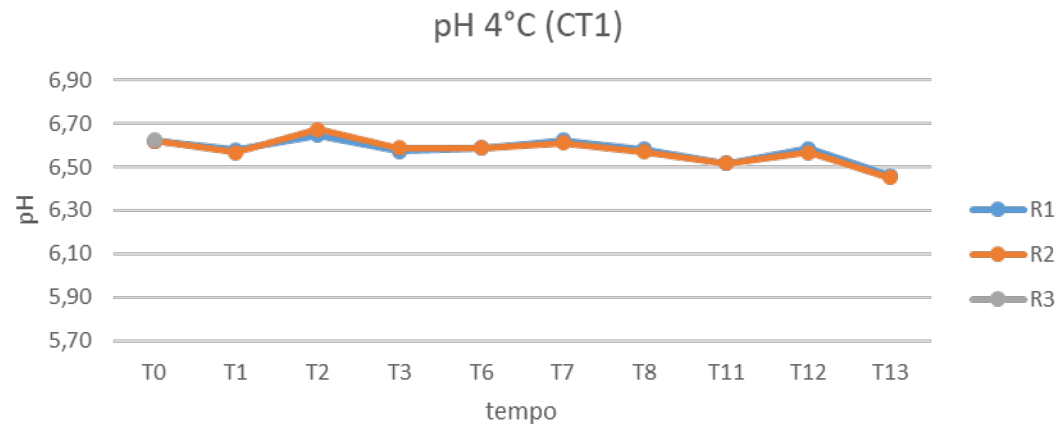
- Di produzione industriale (CT2)

Tempo	RICERCA C. jejuni in 10g	LATTOBACILLI UFC/g	pH	aW
T0	Assente	<10	5,92	0,99
T13	Assente	<10	5,96	0,99

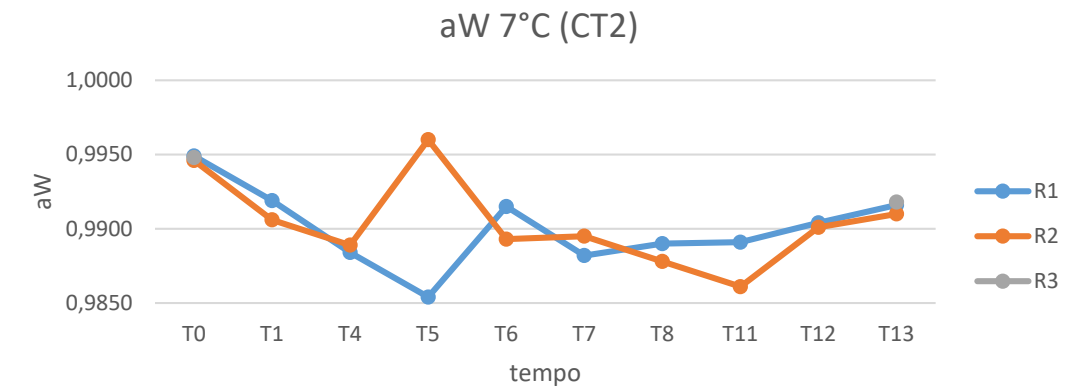
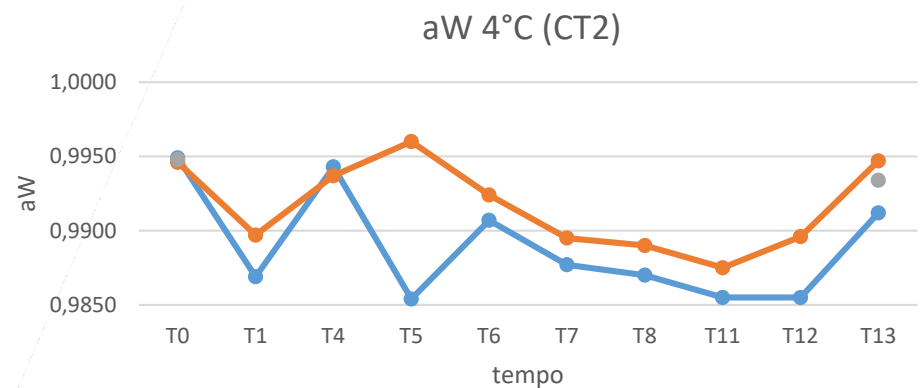
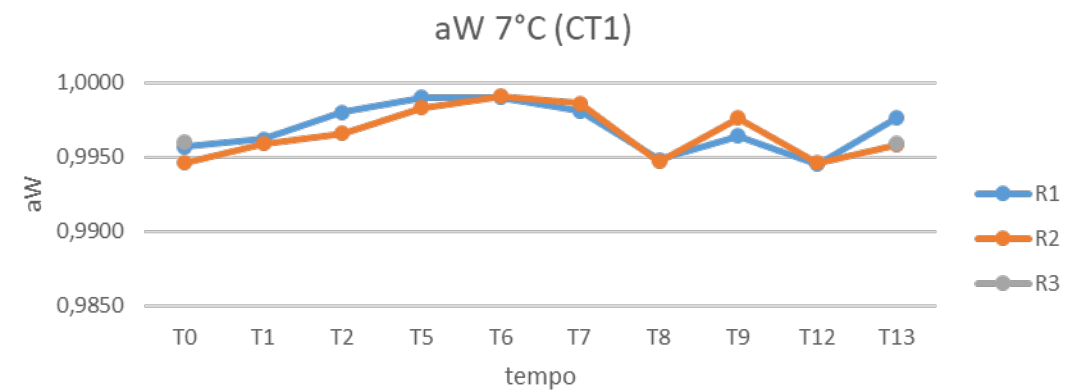
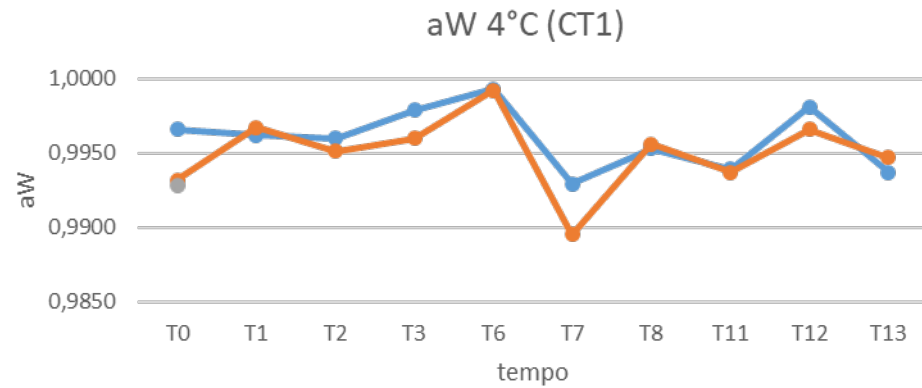


RISULTATI pH RICOTTA

- V= max 1% peso alimento
- Inoculo per ambedue le prove → $2 \cdot 10^9$ UFC/ml (9,30 log)

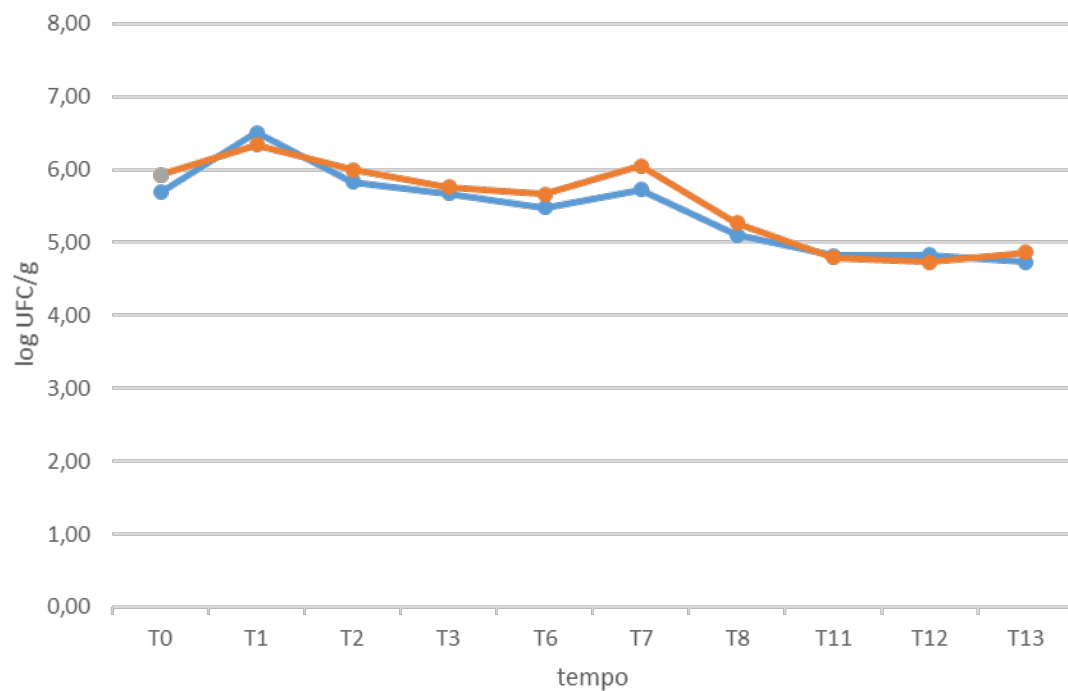


RISULTATI aW RICOTTA

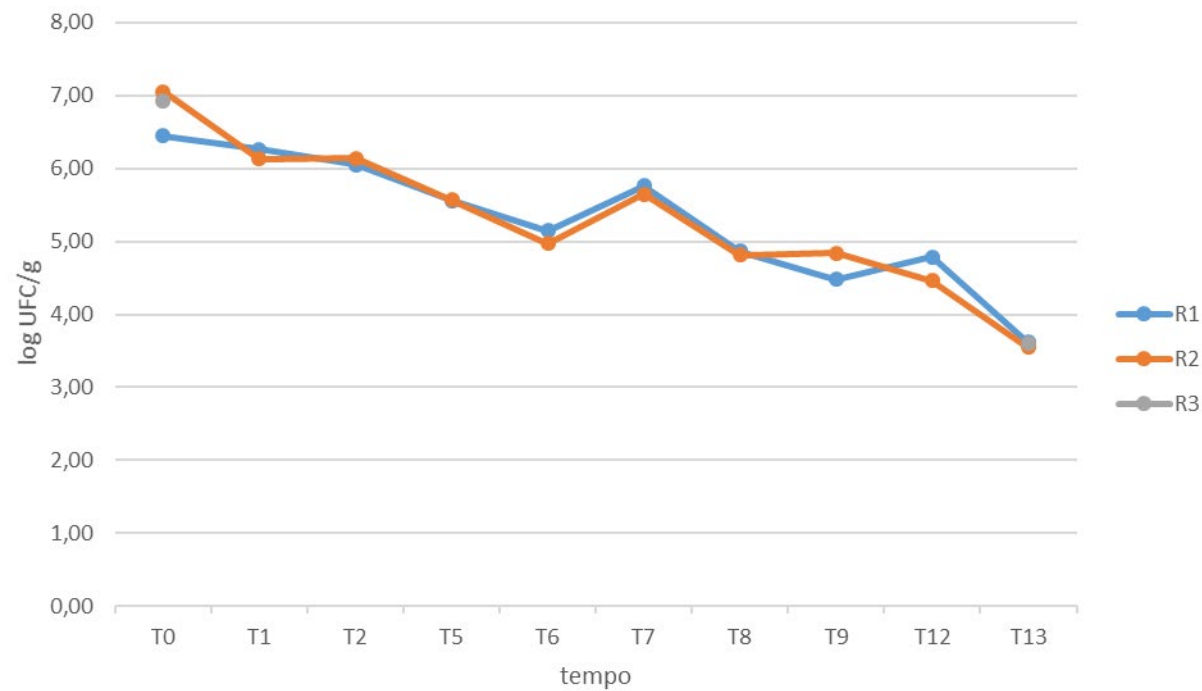


RISULTATI CT1 NUMERAZIONE *C. jejuni* RICOTTA

curva di inattivazione Campylobacter 4°C (CT1)

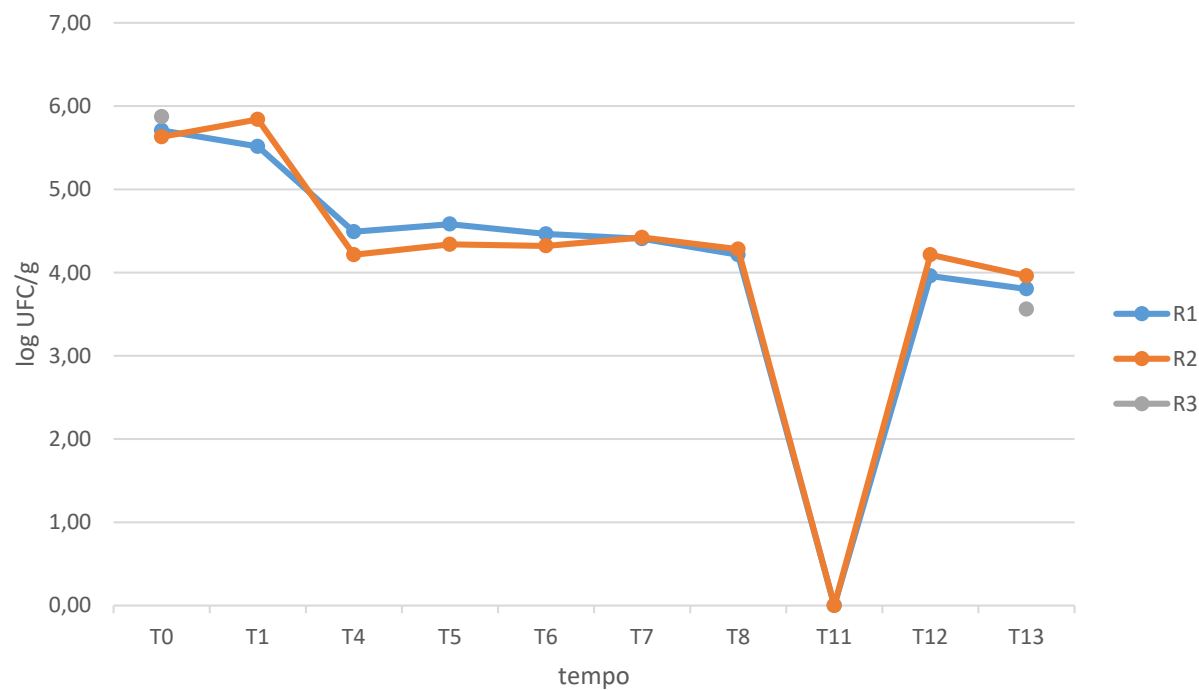


curva di inattivazione Campylobacter 7°C (CT1)

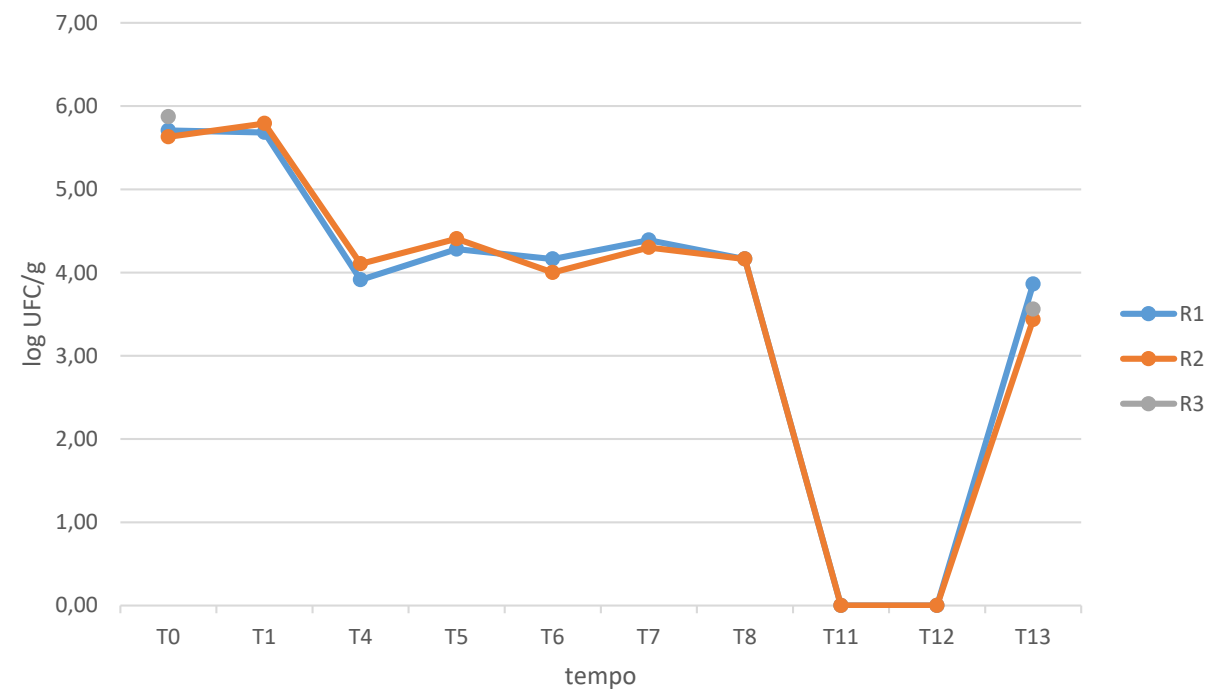


RISULTATI CT₂ NUMERAZIONE *C. jejuni* RICOTTA

curva di inattivazione Campylobacter 4°C (CT₂)



curva di inattivazione Campylobacter 7°C (CT₂)

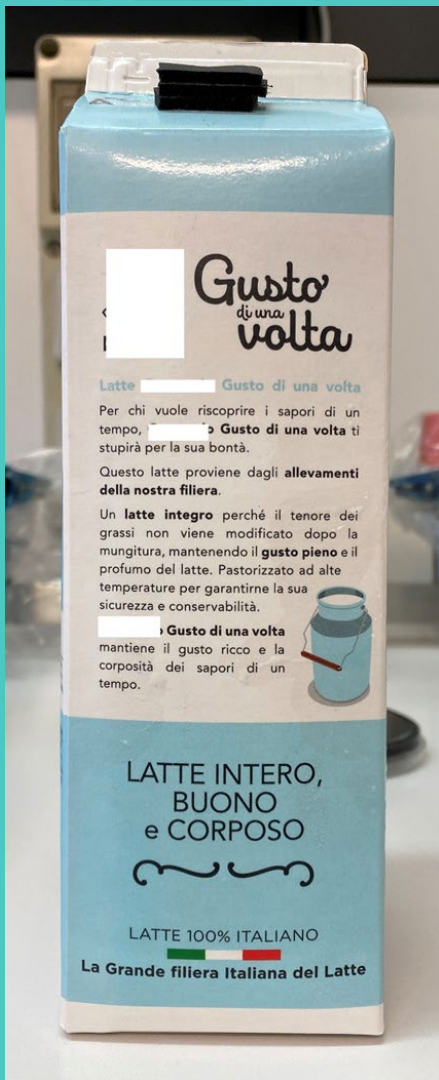




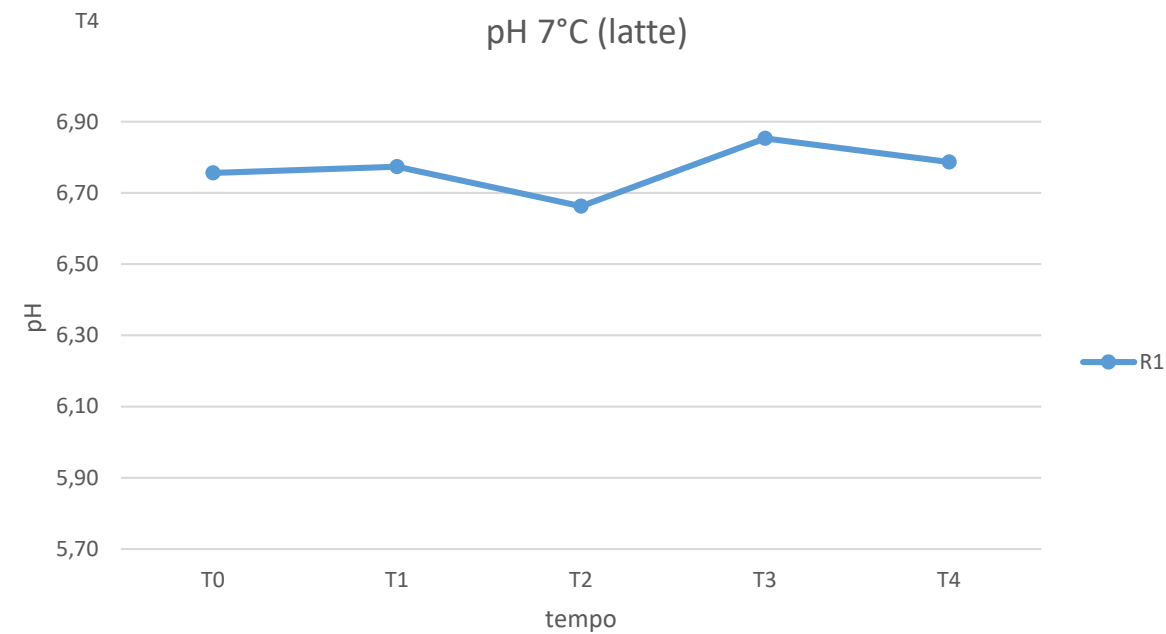
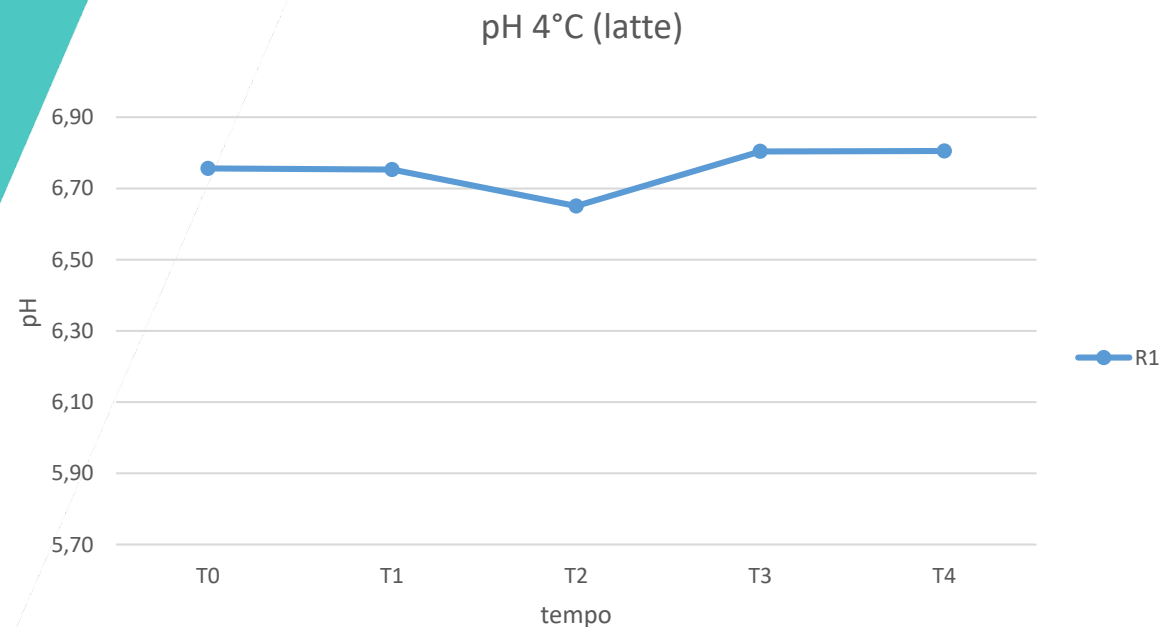
CONTROLLI NEGATIVI (K-) LATTE

Tempo	RICERCA C. jejuni in 10ml	LATTOBACILLI UFC/ml	pH
T0	Assente	<10	6,76
T4	Assente	<10	6,76

IZS



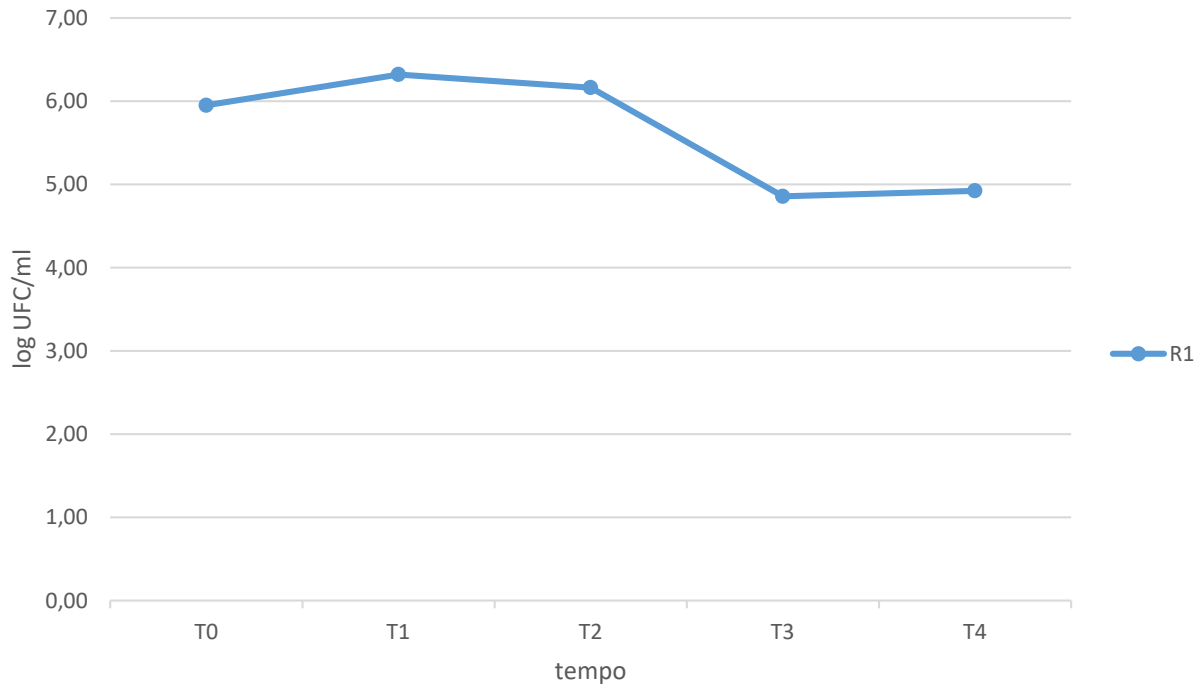
RISULTATI pH LATTE



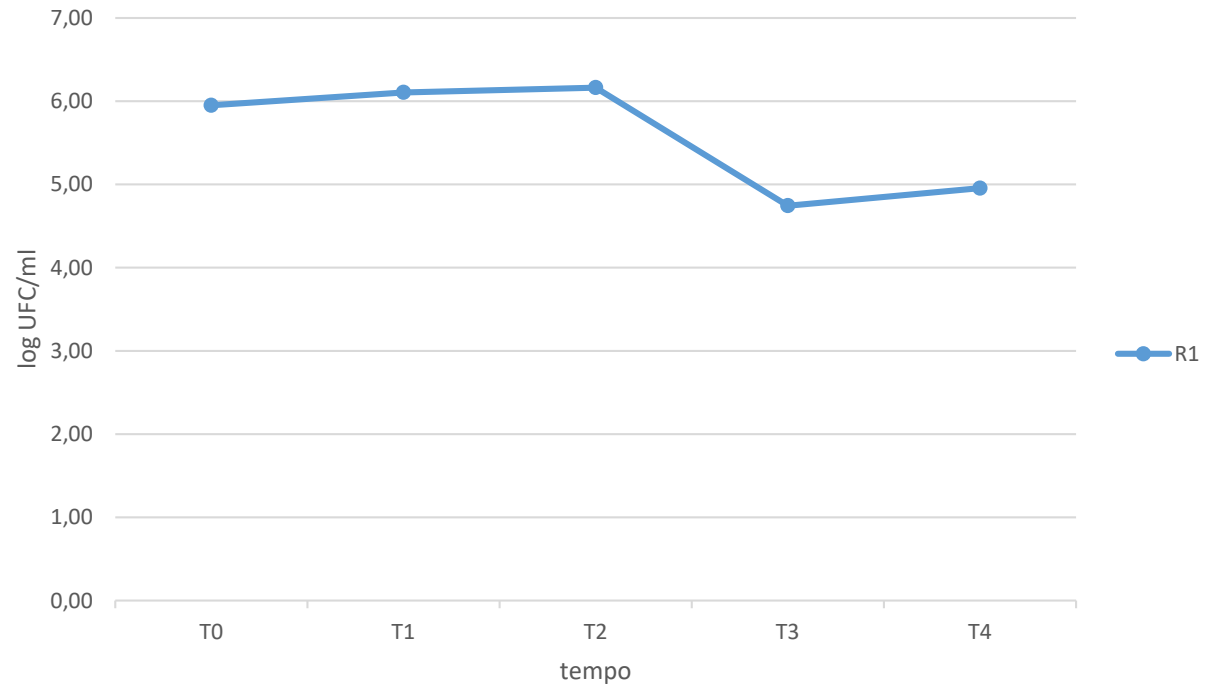
RISULTATI NUMERAZIONE *C. jejuni* LATTE

- V= max 1% peso alimento

curva di inattivazione Campylobacter 4°C (latte)

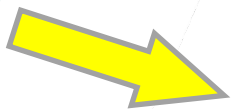


curva di inattivazione Campylobacter 7°C (latte)



DISCUSSIONI DEI RISULTATI: NUMERAZIONE *C. jejuni* (LOG₁₀)

	CACIOTTA	RICOTTA CT1		RICOTTA CT2		LATTE	
	14°C	4°C	7°C	4°C	7°C	4°C	7°C
durata	8 giorni	14 giorni	14 giorni	14 giorni	14 giorni	5 giorni	5 giorni
T0	/	5,84	6,81	5,74	5,74	5,95	5,95
T4	3,29	5,64	5,83	4,35	4,01	4,92	4,95
T FINE	<10	4,80	3,59	3,77	3,62	4,92	4,95
T0 - T FINE	/	-1,05	-3,22	-1,96	-2,12	-1,03	-1,00



Ricerca di forme vitali di *Campylobacter spp.* in matrici alimentari ottenute da ruminanti mediante qPCR

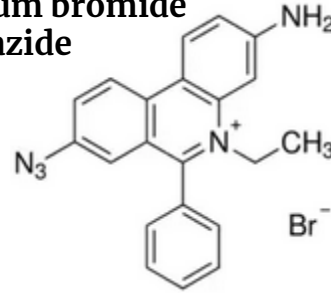
Nell'analisi diretta con qPCR è fondamentale distinguere le forme vitali da quelle non vitali per definire la sicurezza igienica degli alimenti.

Forme rilevabili mediante qPCR su DNA:

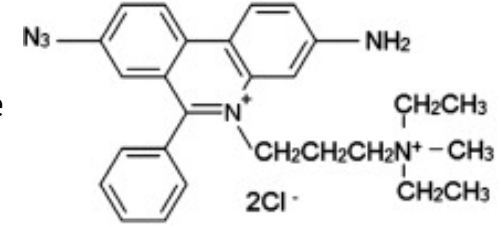
- Forme vitali capaci di accrescersi in mezzi colturali;
- Forme vitali non coltivabili (VBNC);
- Cellule integre ma non vitali (membrana non funzionale)

INTERCALANTI DEL DNA

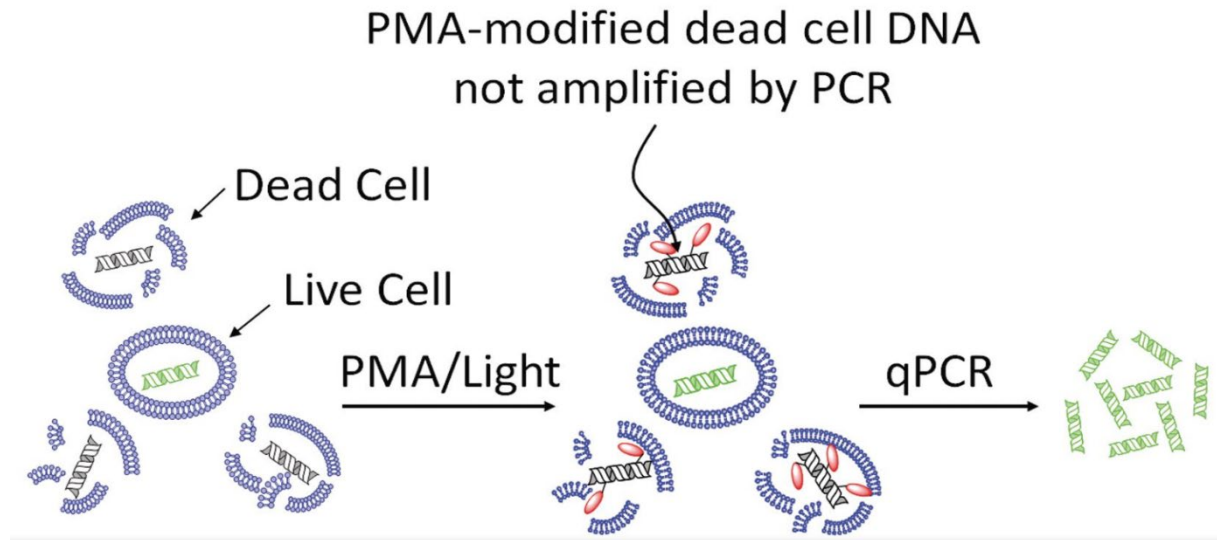
EMA,
Ethidium bromide
monoazide



PMA,
Propidium
monoazide



Azione degli intercalanti del DNA



IZS

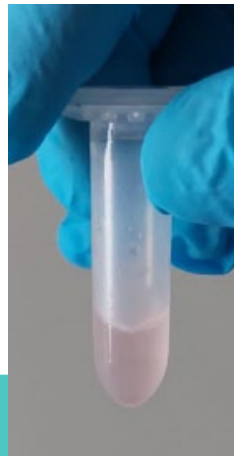
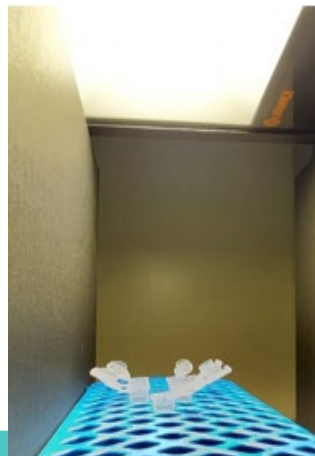
T E R A M O

ISTITUTO
ZOOFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

ESEMPIO DI APPLICAZIONE A CAMPIONI DI LATTE INTERO



- Centrifugazione di 25 ml di latte intero ed eliminazione del surnatante (il grasso va rimosso con un cucchiaino sterile)
- Trasferimento in provetta tipo eppendorf
- Centrifugazione
- Eliminazione di grasso e particelle più grosse con tre lavaggi consecutivi con tampone fosfato (PBS) pH 7.4 sterile
- Risospensione in 1 ml di PBS, aggiunta dell'intercalante ed incubazione al buio per 15 min
- Esposizione alla luce (faro alogeno da 500 – 750 W o faro led da 70 W) per 15 min
- Nuova centrifugazione, rimozione del surnatante, aggiunta di tamponi di lisi e reagent per precipitare il DNA
- Estrazione del DNA con kit commerciale



Analisi di campioni reali per *Campylobacter* spp. vitali

- I campioni di latte erano stati analizzati secondo la norma **UNI EN ISO 10272-2:2017**, 5 colonie per campione sono state isolate e identificate mediante il test di PCR: **NESSUN POSITIVO**
- Testati tre ceppi di *C. jejuni* per numerazione secondo **UNI EN ISO 10272-2:2017** e rilevamento con **EMA-qPCR**:
 - evidente variabilità tra ceppi;
 - evidente vantaggio dell'uso di **EMA-qPCR** nel rilevare VBNC di *C. jejuni* 11218 e *C. jejuni* M1 in latte

Efficienza della **EMA-qPCR** per rilevare e quantificare forme vitali di *Campylobacter* spp. in latte nettamente superiore a conta vitale.

CONCLUSIONI

- Nei casi di **ricotta e latte** da noi testati come modelli, durante i CT e fino alla fine, concentrazioni di *C. jejuni* che rappresentano ancora un rischio per la salute del consumatore (dose infettante = **500 UFC/180ml latte**)

Robinson, D. A. (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. British medical journal (Clinical research ed.), 282(6276), 1584.

- Nel caso della **caciotta**, questo rischio è rimasto tale fino all'**ottavo giorno** dall'inoculo, trascorsi i quali anche la ricerca di *C. jejuni* ha dato esito negativo → interruzione del CT.

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

