

IL CHALLENGE TEST INTEGRATO: UN NUOVO APPROCCIO PER LA VALUTAZIONE QUANTITATIVA DEL RISCHIO *LISTERIA* NEI PRODOTTI READY TO EAT

Integrated challenge test: a new approach evaluating quantitative risk assessment of Listeria in ready to eat foods

Colombo Stefano¹, Romani Marco^{2*}, Romani Chiara¹, Matteini Paolo¹

*Corresponding author. Tel: (+39) 335470668. E-mail: marco.romani@silliker.it

¹Merieux NutriSciences - Lyon, France.

²Silliker Italia Spa - Prato, Italia.

ABSTRACT

The study was aimed to predict the maximum concentration of *Listeria monocytogenes* during the shelf life in chicken liver paté. The prediction has been performed using the integrated challenge test: a test based on the interaction between indigenous lactic flora and *L. monocytogenes* and their growth parameters. Two different approaches were investigated: the former is based on the time difference between the onset of the *L. monocytogenes* and the lactic flora stationary phases, while the latter is based on the lactic flora concentration capable to induct the stationary phase of *L. monocytogenes*. Three different strains of *L. monocytogenes*, isolated from meat products, were used to perform three challenge tests. Triplicate samples from three different batches of liver paté were inoculated with a single-strain inoculum of 1.8 Log CFU/g. Samples were then stored at 4°C, 8°C and 12°C. *Lactobacillus* spp. (ISO 15214:1998) and *L. monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-02:2005) plate counts were performed daily on each sample until the stationary phase was reached by both populations. The challenge test results were input in the Combase software to determine the growth parameters, later used for the calculation method. Predictive data were then statically assessed against the results of two additional challenge tests using triplicate samples from two different batches, the same strains and the same single-strain inoculum. Samples from the first batch were stored for 5 days at 4°C + 5 days at 8°C + 5 days at 12°C; samples from the second batch were stored for 3 days at 4°C + 3 days at 8°C + 4 days at 12°C. The results obtained showed that both approaches provided results very close to the reality. Therefore the Integrated challenge test is useful to determine the maximum concentration of *L. monocytogenes*, by simply knowing the concentration of the concerned microbial populations at a given time.

Keywords: *L. monocytogenes*, Challenge test, Anti-listerial activity, Lactic acid bacteria.

INTRODUZIONE

Visto l'elevato tasso di mortalità della listeriosi, 20-30% (Andreoletti *et al.*, 2007), e la crescente richiesta di alimenti *ready to eat* (RTE), il Regolamento 2073/2005 e, in seguito, l'agenzia francese per la sicurezza alimentare (AFSSA) hanno gettato le fondamenta per effettuare una stima quantitativa del rischio di *L. monocytogenes* attraverso la tecnica del challenge test, una prova di laboratorio atta a valutare la crescita del patogeno inoculato artificialmente in un alimento. Tale test può essere eseguito con due finalità: la valutazione del potenziale di crescita (*Growth potential*) e del massimo tasso di crescita giornaliero di *L. monocytogenes* (*Maximum growth rate*). Il primo

metodo fornisce risultati sperimentali, con possibilità di predizione soltanto al tempo zero; il secondo, poggiando sulla microbiologia predittiva, fornisce dati più lungimiranti, ma non tiene conto di tutti i parametri intrinseci in gioco nell'alimento; pertanto è incompleto. L'obiettivo del presente studio è stato quello di mettere a punto un challenge test integrato che, partendo dai dati sperimentali e attraverso un calcolo predittivo, prendesse in considerazione l'interazione di *L. monocytogenes* con la flora lattica indigena e i rispettivi parametri di crescita (fase di latenza, stazionaria e massimo tasso di crescita). Tale tipo di test è stato condotto su un campione di paté di fegato che, per i valori dei parametri chimico-fisici

(pH e A_w) e del *Growth potential* ($>0,5 \text{ Log UFC/g}$), rappresenta un substrato di accrescimento per *L. monocytogenes*.

MATERIALI E METODI

La flora lattica indigena del pat   è stata sottoposta ai seguenti test: *agar well diffusion assay* (Parente *et al.*, 1995) e *agar drop test* (Paparella *et al.*, 1992); questo al fine di stabilire, la presenza e la natura delle sostanze con attivit   anti-Listeria. In seguito, sono stati analizzati 3 lotti di pat  , per ognuno dei quali sono stati allestiti 3 challenge test a 3 temperature diverse e fisse nel tempo: 4  C, 8  C e 12  C. Ogni challenge test    stato condotto in triplo, inoculando 3 ceppi diversi (x , α e z) di *L. monocytogenes* in concentrazione di circa 1,8 UFC/g (in conformit   alla guida AFSSA, 2008). I ceppi selezionati provenivano da matrici prevalentemente carnee (pat  , salumi, ATCC). A partire dal tempo zero    stata eseguita, per ogni campione, l'analisi dei batteri lattici (ISO 15214:1998) e di *L. monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-02:2005) fino al raggiungimento della fase stazionaria di entrambe le popolazioni. I risultati giornalieri dei challenge test, relativi a *L. monocytogenes* e alla flora lattica, sono stati inseriti nel software *Combase DMfit* per ottenere la modellazione delle curve ed i seguenti parametri di crescita: durata della fase di latenza (gg), tasso di crescita giornaliero (Log/gg), inizio fase stazionaria (gg) e concentrazione al raggiungimento della fase stazionaria (Log UFC/g). Per ognuno di questi dati, ottenuti alle 3 temperature, sono stati calcolati i valori medi utilizzati poi nel calcolo predittivo per definire la massima concentrazione di *L. monocytogenes* raggiunta durante tutta la shelf life. La predizione    stata effettuata a partire da due ulteriori challenge test eseguiti su due lotti stoccati a diverso gradiente di temperatura. Il primo: 5gg a 4  C + 5 gg a 8  C + 5 gg a 12  C; il secondo: 3 gg a 4  C + 3 gg a 8  C + 4 gg a 12  C. Ogni challenge test    stato eseguito in triplo, inoculando sempre i 3 diversi ceppi di *L. monocytogenes* (x , α e z).

Il calcolo predittivo    avvenuto attraverso due approcci: quello del tempo e quello della concentrazione critica. Il primo consiste nel considerare l'eventuale differenza di tempo con cui *L. monocytogenes* precede la flora lattica nell'entrare in fase stazionaria. Il secondo, invece, prende in considerazione la concentrazione critica della flora lattica tale da inibire *L. monocytogenes*. Al fine di validare statisticamente il calcolo, le medie dei dati predittivi sono state confrontate (t-Test) con quelle dei dati sperimentali per entrambi gli approcci.

RISULTATI

Dall'*agar well diffusion assay*    emerso che la flora lattica indigena possiede attivit   antilisteria nei confronti dei 3 ceppi saggiati: x , α e z . L'*agar drop test* ha evidenziato che tale azione    sostenuta

dagli acidi organici. I risultati dei 3 challenge test condotti alle 3 diverse temperature, sono stati inseriti nel software *Combase DMfit* (Figura 1) per ottenere i parametri di crescita sia di *L. monocytogenes* che della flora lattica, riportati come valori medi nella Tabella 1. Partendo da questi parametri,    stato possibile costruire il calcolo predittivo sia con l'approccio del tempo che della concentrazione critica. Il fine ultimo di entrambi gli approcci    stato quello di predire la massima concentrazione raggiunta dal patogeno durante i test sperimentali. Nel primo caso, visto che la produzione di acidi organici da parte della flora lattica avviene durante la crescita esponenziale, *L. monocytogenes* entra in fase stazionaria prima della popolazione indigena. Partendo da questa differenza temporale,    stato definito il tempo utile di crescita per *L. monocytogenes* e la massima concentrazione raggiunta. Il secondo approccio si basa sull'osservazione che esiste una concentrazione critica di batteri lattici tale da indurre, indipendentemente dal ceppo e dalla temperatura ($P < 0,05$), l'inibizione del patogeno. Pertanto,    stata definita la massima concentrazione raggiunta da *L. monocytogenes* nel tempo necessario alla flora lattica per arrivare a tale concentrazione critica. Al fine di validare il calcolo proposto, i dati predittivi, ottenuti con entrambi gli approcci, sono stati confrontati con i dati sperimentali provenienti dai due challenge test condotti con gradiente di temperatura (Tabelle 2 e 3). L'analisi statistica (t-Test) ha dimostrato per il primo approccio che non esistono differenze significative ($\alpha < 0,05$) tra le medie dei dati predittivi e sperimentali; nel secondo approccio, invece,    stata riscontrata una lieve differenza. Tuttavia essendo la deviazione standard in ambedue i lotti $< 0,2 \text{ UFC/g}$, tale differenza    imputabile all'incertezza del metodo di conta e non compromette la validit   dell'approccio, i cui risultati possono essere corretti calcolando i limiti di confidenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dallo studio condotto    emerso che, al fine di effettuare una stima quantitativa del rischio il pi   realistica possibile,    importante prendere in considerazione tutte le caratteristiche intrinseche di un alimento compresa la presenza di una flora lattica antagonista. Pertanto prima di allestire un challenge test integrato    necessario caratterizzare e quantificare la popolazione di batteri lattici indigeni verificando, attraverso opportuni test, l'eventuale azione antilisteria e le sostanze responsabili coinvolte. L'esecuzione del challenge test integrato, condotto in seguito, fornisce con l'ausilio del software *Combase DMfit* il resto degli strumenti indispensabili alla costruzione del calcolo predittivo quali: la fase di latenza, il tasso di crescita e la fase stazionaria sia di *L. monocytogenes* che della flora lattica. Il challenge test integrato, pertanto, si pre-

figge, attraverso i due diversi approcci, di andare incontro alle esigenze sia dell'operatore del settore alimentare che della sanità pubblica. Vista la precisione del calcolo predittivo è possibile, infatti, definire, conoscendo la concentrazione della flora lattica e di *L. monocytogenes* in un qualsiasi momento della shelf life, la massima concentrazione raggiunta dal patogeno. Tale tipo di test può essere applicato ad altre matrici alimentari purché rappresentino un terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes* e possiedano una flora lattica con azione inibente verso il patogeno.

BIBLIOGRAFIA

1. AFSSA, 2008. Technical guidance document on shelf life studies for *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods – version 2 november 2008. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation ed.; Maisons-Alfort: Francia.
2. Andreoletti O., Budka H., Buncic S., Colin P., Collins J.D., De Koeijer A., Griffin J., Haveaar A., Hope J., Klein G., Kruse H., Magnino S., Martínez López A., McLauchlin J., Nguyen-The C., Noeckler K., Noerrung B., Prieto Maradona M., Roberts T., Vågsholm I., Vanopdenbosch E. 2007. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. The EFSA Journal 599:1-42.
3. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization ed., Ginevra, Svizzera.
4. Paparella A., Ruocco G., Barbieri B. 1992. Lattobacilli come inibitori della microflora delle carni fresche. (Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie – volume XLVI – Venezia S. Giuliano, 30 settembre, 1, 2, 3 ottobre 1992).
5. Parente, E., Brienza, C., Moles, M., Ricciardi, A. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. J. Microbiol. Meth. 22:95-108.
6. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 338 del 22.12.2005.
7. UNI EN ISO 11290-2/A1. 2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* - Parte 2: Metodo per la conta. Ente Nazionale Italiano di Unificazione ed., Milano, Italia.



Figura 1. Esempio di utilizzo del Software Combase DMfit. In alto a sinistra è riportato il riquadro di inserimento degli input (tempo-concentrazione logaritmica); nella parte inferiore quello degli output (concentrazione iniziale, durata della fase di latenza, massimo tasso di crescita giornaliero). La massima concentrazione e il tempo necessario per arrivarvi si ottiene impostando la funzione trilinear.

Tabella 1. Valori medi dei parametri di crescita di *L. monocytogenes* (L.m.) e dei batteri lattici (LAB) alla temperatura di 4, 8, 12°C ottenuti dal software *Combase DMfit*.

| | LAB Fase latenza gg | LAB Growth rate Log/gg | LAB Fase stazionaria Log UFC/g | LAB Fase stazionaria gg | L.m. Fase latenza gg | L.m. Growth rate Log/gg | L.m. Fase stazionaria Log UFC/g | L.m. Fase stazionaria gg |
|------|------------------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|-----------------------------------|
| 4°C | 2,82 | 0,34 | 8,39 | 20,41 | 4,09 | 0,11 | 2,87 | 19,12 |
| 8°C | 1,21 | 0,85 | 8,56 | 8,59 | 2,42 | 0,37 | 3,09 | 7,5 |
| 12°C | 0,65 | 1,47 | 8,7 | 5,13 | 1,24 | 0,7 | 3,14 | 4,41 |

Tabella 2. Confronto tra le medie dei dati predittivi e sperimentali della massima concentrazione di *L. monocytogenes* del primo e secondo lotto (approccio del tempo). Apici uguali nella stessa riga indicano popolazioni statisticamente uguali.

Il t-Test è stato applicato alle medie dei due dati risultate statisticamente uguali ($\alpha < 0,05$) in entrambi i lotti.

| Challenge | Lotto 1 | | Lotto 2 | |
|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Dati predittivi Log UFC/g | Dati sperimentali Log UFC/g | Dati predittivi Fase latenza | Dati sperimentali Growth rate |
| Ceppo x, 1° repl. | 3,95 | 3,8 | 3,86 | 3,81 |
| Ceppo x, 2° repl. | 3,94 | 3,9 | 3,63 | 3,87 |
| Ceppo x, 3° repl. | 3,7 | 3,81 | 3,86 | 3,69 |
| Ceppo α , 1° repl. | 3,69 | 3,62 | 3,87 | 3,81 |
| Ceppo α , 2° repl. | 3,47 | 3,69 | 3,66 | 3,9 |
| Ceppo α , 3° repl. | 3,76 | 3,66 | 3,8 | 3,88 |
| Ceppo z, 1° repl. | 3,55 | 3,71 | 3,87 | 3,78 |
| Ceppo z, 2° repl. | 3,74 | 3,65 | 3,98 | 3,79 |
| Ceppo z, 3° repl. | 3,68 | 3,85 | 3,92 | 3,72 |
| Media | 3,72 ^a | 3,74 ^a | 3,81 ^b | 3,81 ^b |

Tabella 3. Confronto tra le medie dei dati predittivi e sperimentali della massima concentrazione di *L. monocytogenes* del primo e secondo lotto (approccio della concentrazione critica). Lettere diverse nella stessa riga indicano differenze significative per $\alpha < 0,05$.

Il t-Test è stato applicato alle medie dei due dati risultate statisticamente diverse ($\alpha < 0,05$) in entrambi i lotti.

| Challenge test | Lotto 1 | | Lotto 2 | |
|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | Dati predittivi Log UFC/g | Dati sperimentali Log UFC/g | Dati predittivi Log UFC/g | Dati sperimentali Log UFC/g |
| Ceppo x, 1° repl. | 4,15 | 3,8 | 4,06 | 3,81 |
| Ceppo x, 2° repl. | 4,14 | 3,9 | 3,83 | 3,87 |
| Ceppo x, 3° repl. | 3,9 | 3,81 | 4,06 | 3,69 |
| Ceppo α , 1° repl. | 3,89 | 3,62 | 4,07 | 3,81 |
| Ceppo α , 2° repl. | 3,65 | 3,69 | 3,86 | 3,9 |
| Ceppo α , 3° repl. | 3,96 | 3,66 | 4 | 3,88 |
| Ceppo z, 1° repl. | 3,73 | 3,71 | 4,08 | 3,78 |
| Ceppo z, 2° repl. | 3,94 | 3,65 | 4,18 | 3,79 |
| Ceppo z, 3° repl. | 3,88 | 3,85 | 4,12 | 3,72 |
| Media | 3,92 ^a | 3,74 ^b | 4,03 ^c | 3,81 ^d |
| d.s. | 0,16 | 0,1 | 0,12 | 0,07 |