




IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

**Messa a punto di un metodo per la determinazione della
produzione di Biofilm in materiali destinati a venire a
contatto con gli alimenti**




Federica Di Simone

Teramo 15 - 16 dicembre 2015:

Workshop I Laboratori Nazionali di Riferimento per *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes*



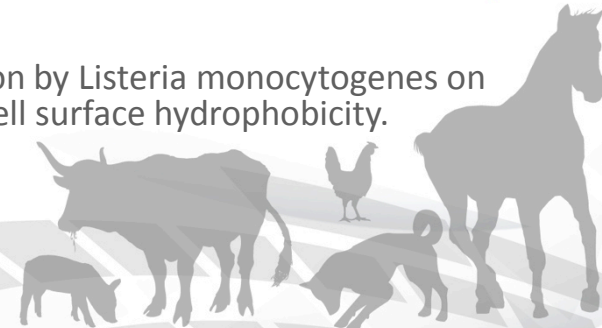
OBIETTIVO



Messa a punto di un protocollo che permettesse di testare l'attitudine di *Listeria monocytogenes* a produrre Biofilm su supporti flessibili, quali sono i materiali normalmente ed ampiamente utilizzati dall'industria alimentare per confezionare alimenti.

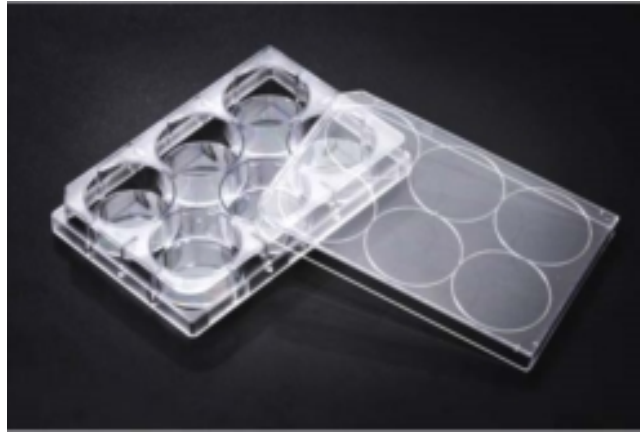


Di Bonaventura et al (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol* 104, 1552-1561.



MATERIALI E METODI

PER L'INCUBAZIONE



STAMPO IN ACCIAIO

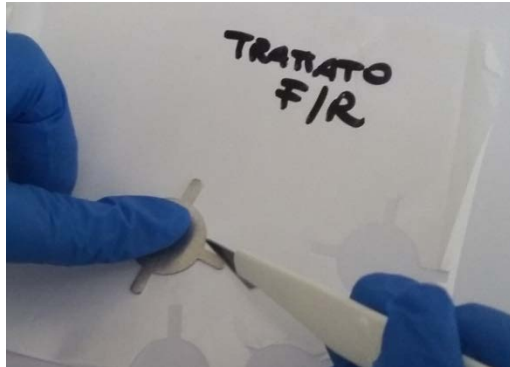


PESO IN ACCIAIO



MATERIALI E METODI

● Preparazione delle sagome:




● Sterilizzazione:

- Lavare in acetone 10% per 10 minuti
- Lavare in acqua deionizzata
- Immergere i substrati in alcool etilico assoluto per 10'
- Lavare in acqua deionizzata
- Asciugare all'aria e sterilizzare in autoclave a 121° C per 15 minuti

Upadhyay, A. et al (2013). Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*.
Food Microbiol 36, 79-89.




MATERIALI E METODI



I supporti vengono posizionati nei pozzetti della piastra da coltura cellulare, immobilizzati sul fondo e mantenuti distesi in modo che non si ripieghino su loro stessi, utilizzando come peso gli anelli in acciaio, anch'essi preventivamente lavati e sterilizzati in autoclave (121° C per 15 minuti).



MATERIALI E METODI



I substrati vengono quindi incubati con l'inoculo *Listeria monocytogenes*, precedentemente adattato alle condizioni da testare, nel nostro caso alla temperatura di 12° C, e standardizzato in terreno BHI alla concentrazione di 10⁸ UFC/ml (OD₆₀₀ 0.125).

- 3 pozzetti positivi: 3 ml di sospensione cellulare
- 1 pozzetto negativo: 3 ml di terreno sterile BHI



INCUBARE
12°C PER 7 GIORNI

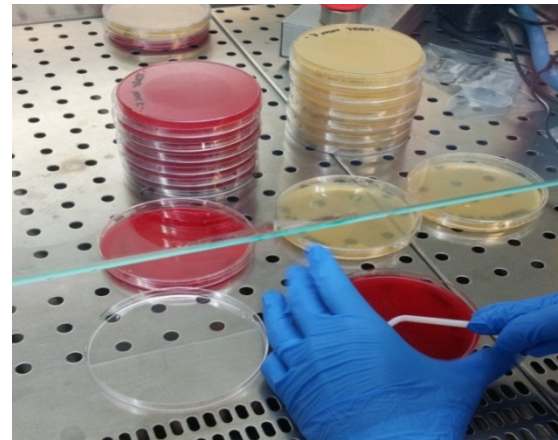


CONTROLLI DI PROCESSO

Numerazione di *Listeria monocytogenes*

1. INOCULO INIZIALE
2. INOCULO FINALE

Per verificare la purezza e la concentrazione dell'inoculo



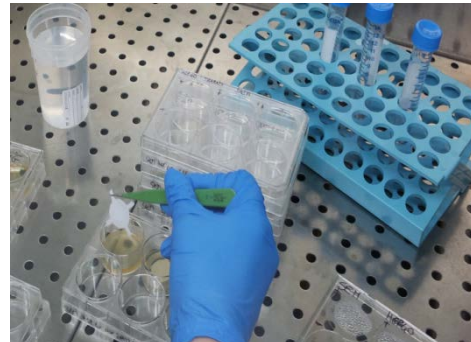
Terreni

- AGAR SANGUE
- ALOA



LAVAGGIO E FISSAZIONE

...al termine dell'incubazione, gli anelli vengono rimossi delicatamente, i supporti lavati in PBS e posti in una nuova piastra. Si procede quindi con la fissazione in incubatore a 60°C per 1h.

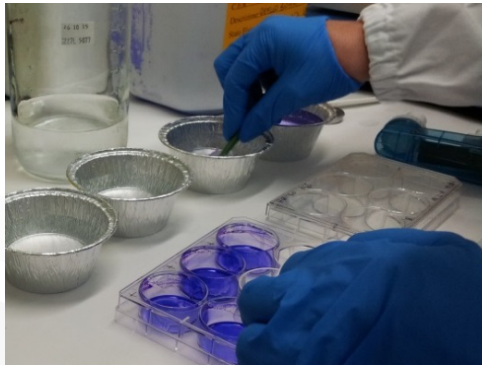
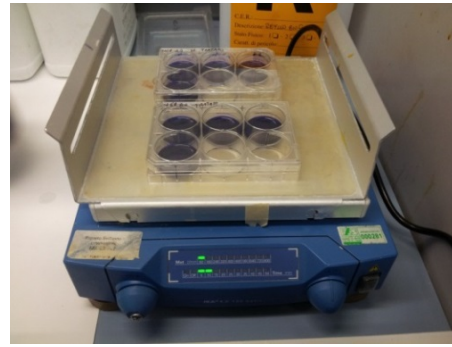


Fissazione
60°C per 1h



COLORAZIONE

Cristal Violetto 0,2%



Asciugatura
37°C



DECOLORAZIONE

LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO (492nm)

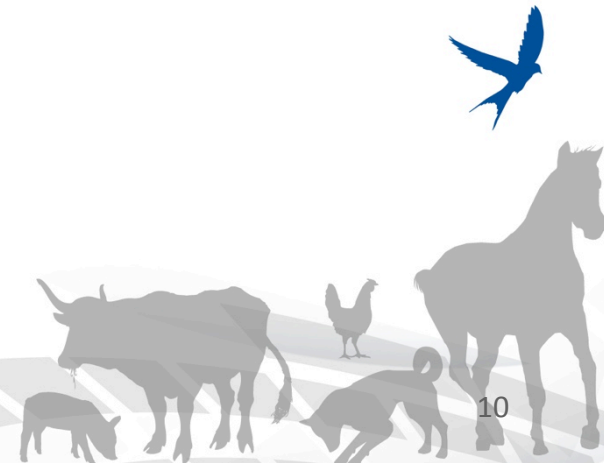
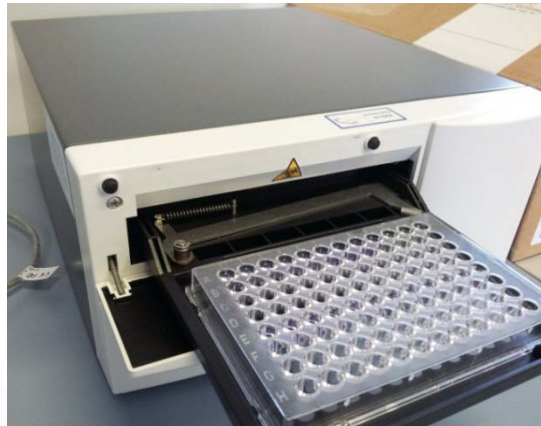
Acido Acetico 33%



200 μ l in 12 replicati
per ogni supporto



Lettura a 492nm



ANALISI DEI RISULTATI

Substrati in analisi:

➤ HGP40

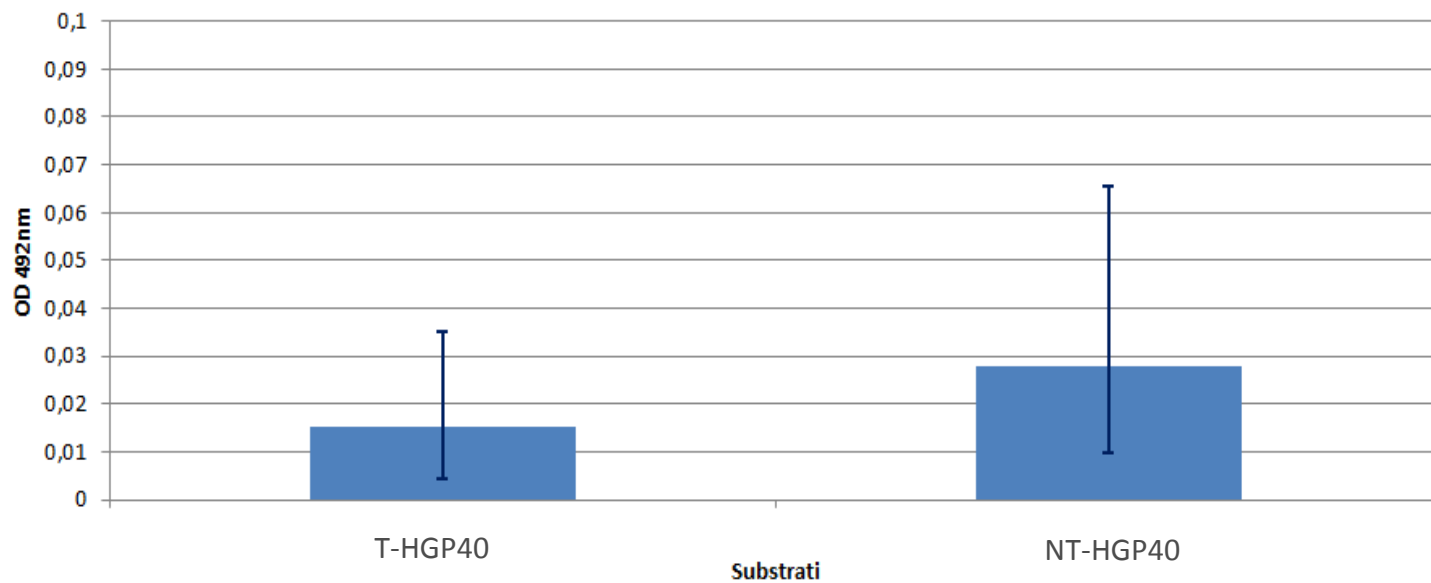
➤ GND35

I dati ottenuti dalla lettura allo spettrofotometro vengono analizzati tramite il test statistico ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla TUKEY ($p < 0.05$)



RISULTATI PRELIMINARI

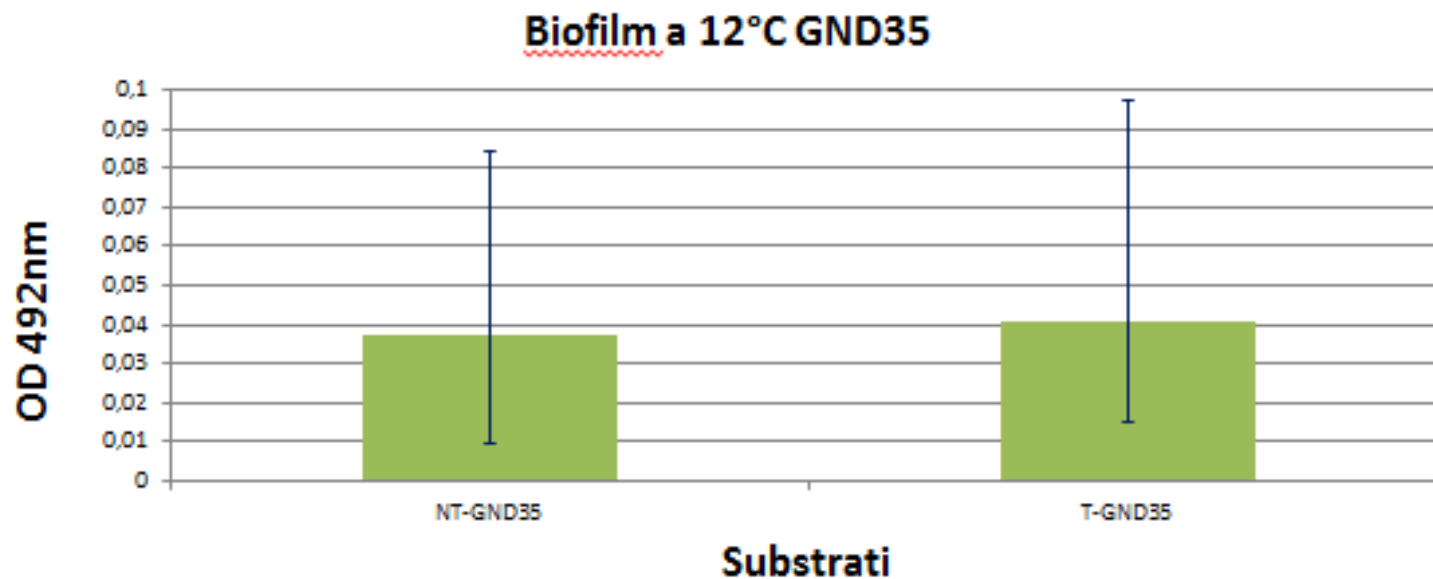
Biofilm a 12°C HGP40



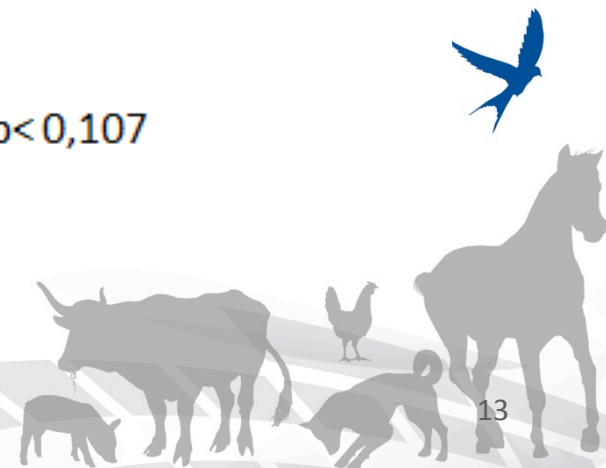
Test ANOVA, seguita dal test di Tukey $p < 0,0001$



RISULTATI PRELIMINARI



Test ANOVA, seguita dal test di Tukey $p < 0,107$

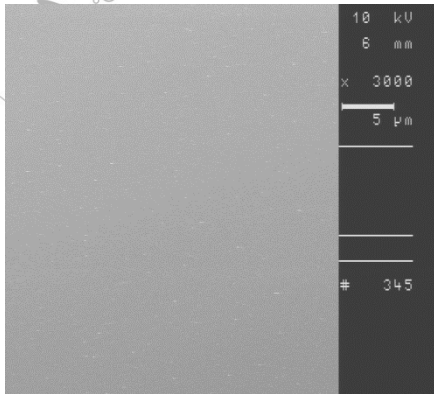


MICROSCOPIA ELETTRONICA

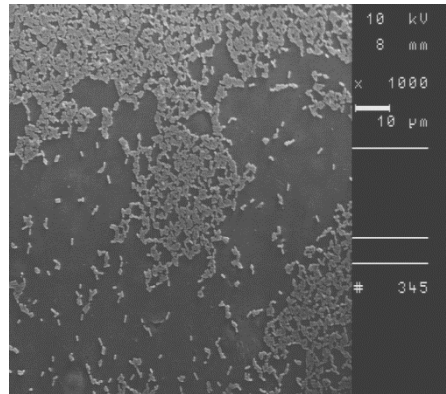
A SCANSIONE

SUPPORTO HGP40

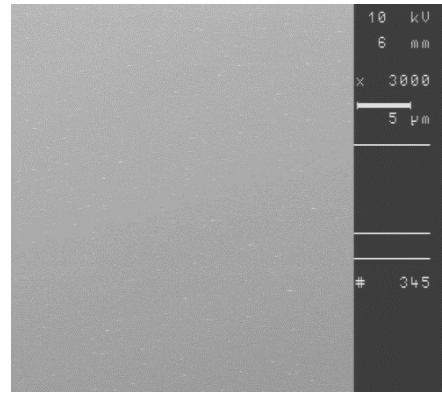
SUPPORTO GND35



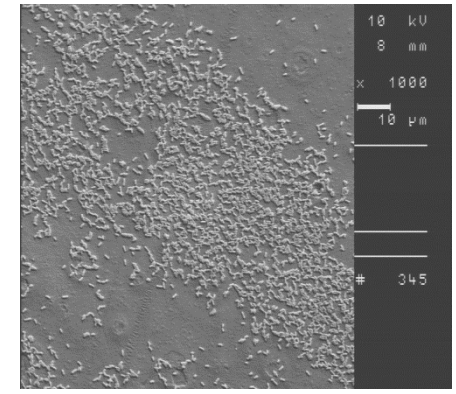
BIANCO - HGP40 N.T.



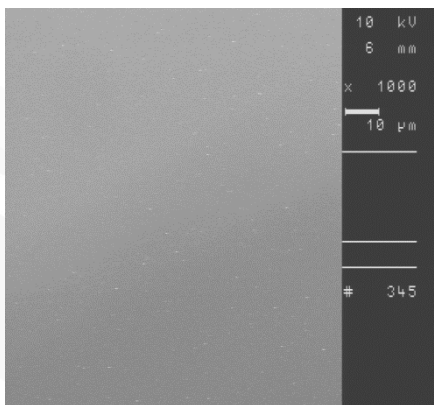
HGP40 N.T.



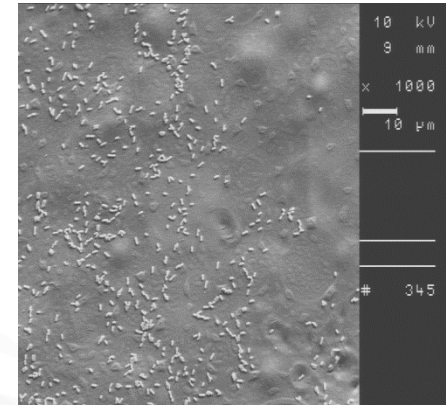
BIANCO - GND35 N.T.



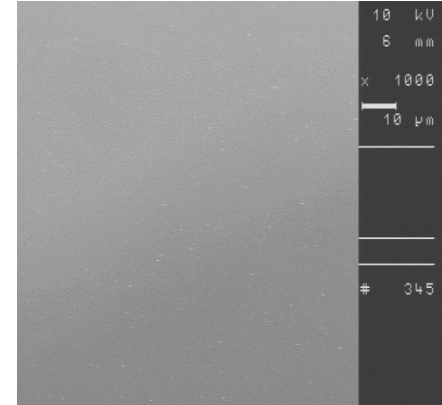
GND35 N.T.



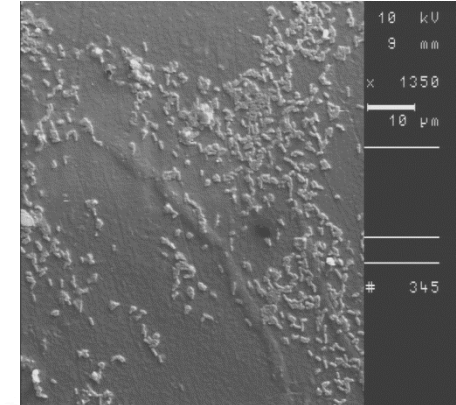
BIANCO - HGP40 T.



HGP40 T.




BIANCO - GND35 T.




GND35 T.



CONCLUSIONI



Tale metodo permette di saggiare i substrati non rigidi utilizzati dall'industria alimentare e valutare così quali sono più idonei al confezionamento degli alimenti, nel caso specifico con lo scopo di ridurre le contaminazioni e limitare il rischio di sviluppo della *Listeria monocytogenes*.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Listeria monocytogenes
National Reference Laboratory

Francesco Pomilio

Patrizia Centorame e Alessandra Cornacchia

LABORATORIO TRASFORMAZIONI SPERIMENTALI

Annafranca Sperandii, Gabriella Centorotola, Patrizia Tucci, Diana Neri

AREA DI ISTOPATOLOGIA DEL REPARTO DI MICROBIOLOGIA DIAGNOSTICA

Annarita D'Angelo

**CENTRO OPERATIVO VETERINARIO DI EPIDEMIOLOGIA, PROGRAMMAZIONE ED
INFORMAZIONE (COVEPI)**

Romolo Salini

