



Listeria monocytogenes

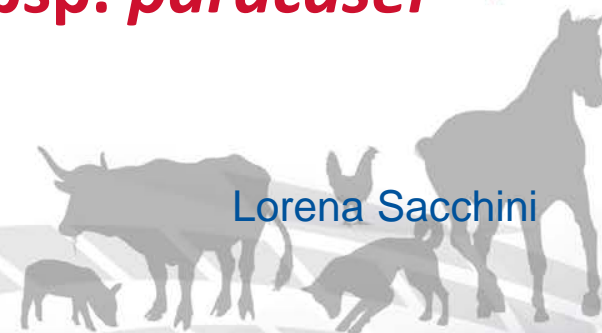
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Inibizione della crescita di *Listeria monocytogenes* da parte di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*



Teramo, CIFIV, 16/12/2015

Lorena Sacchini



Listeria can hide in many foods



Sprouts



Deli meats &
Hot dogs
cold, not heated



Smoked seafood



Soft cheeses



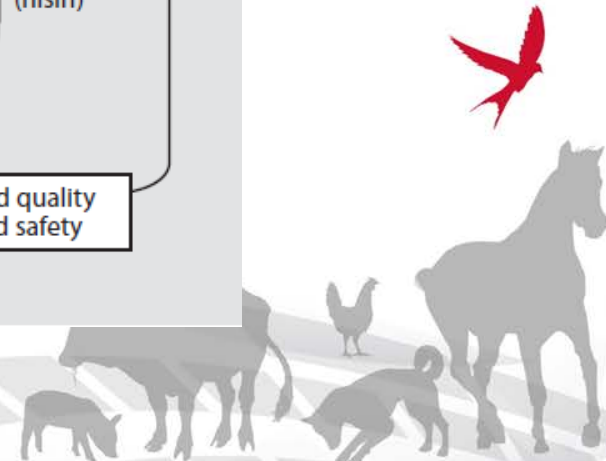
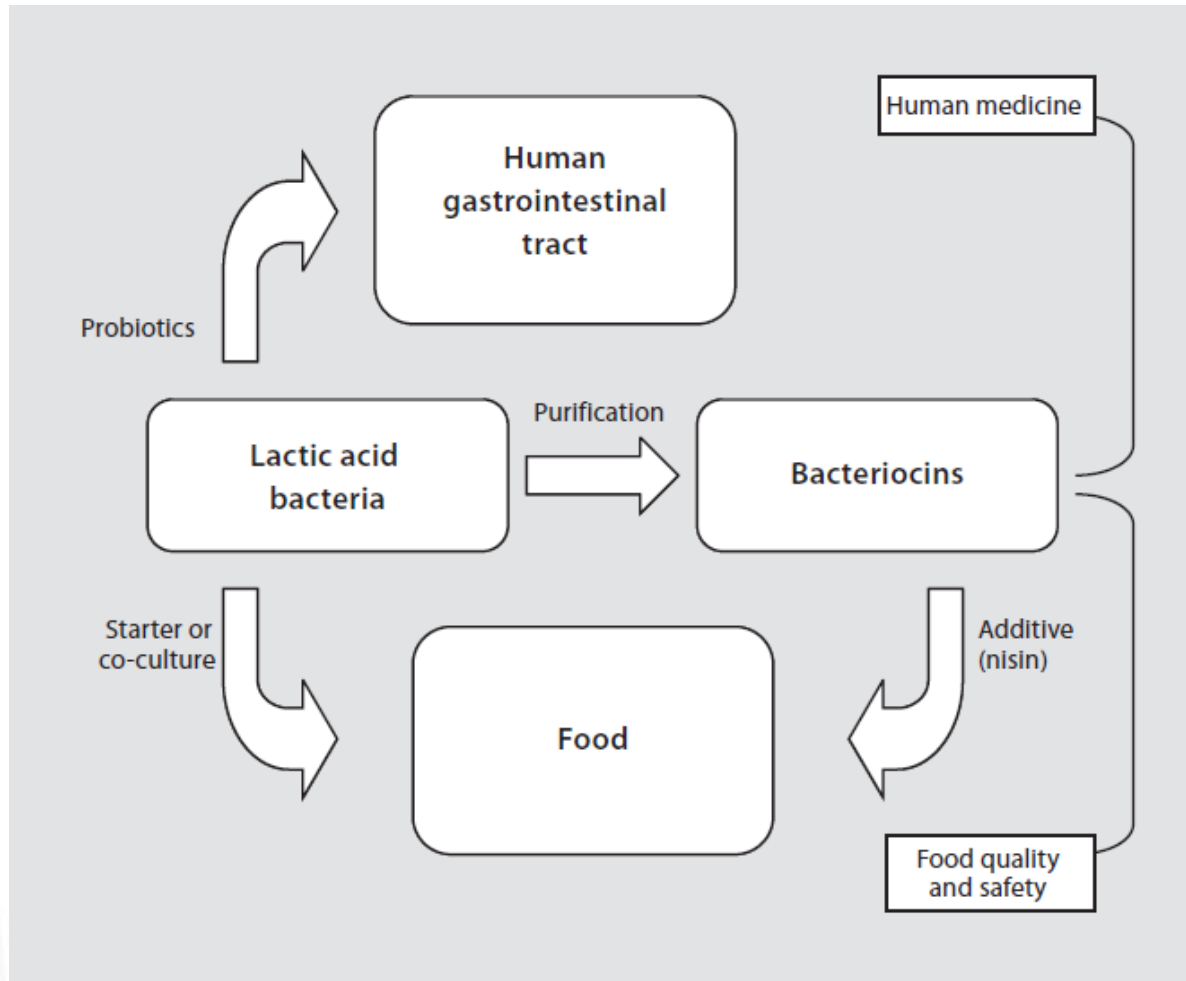
Raw milk
unpasteurized

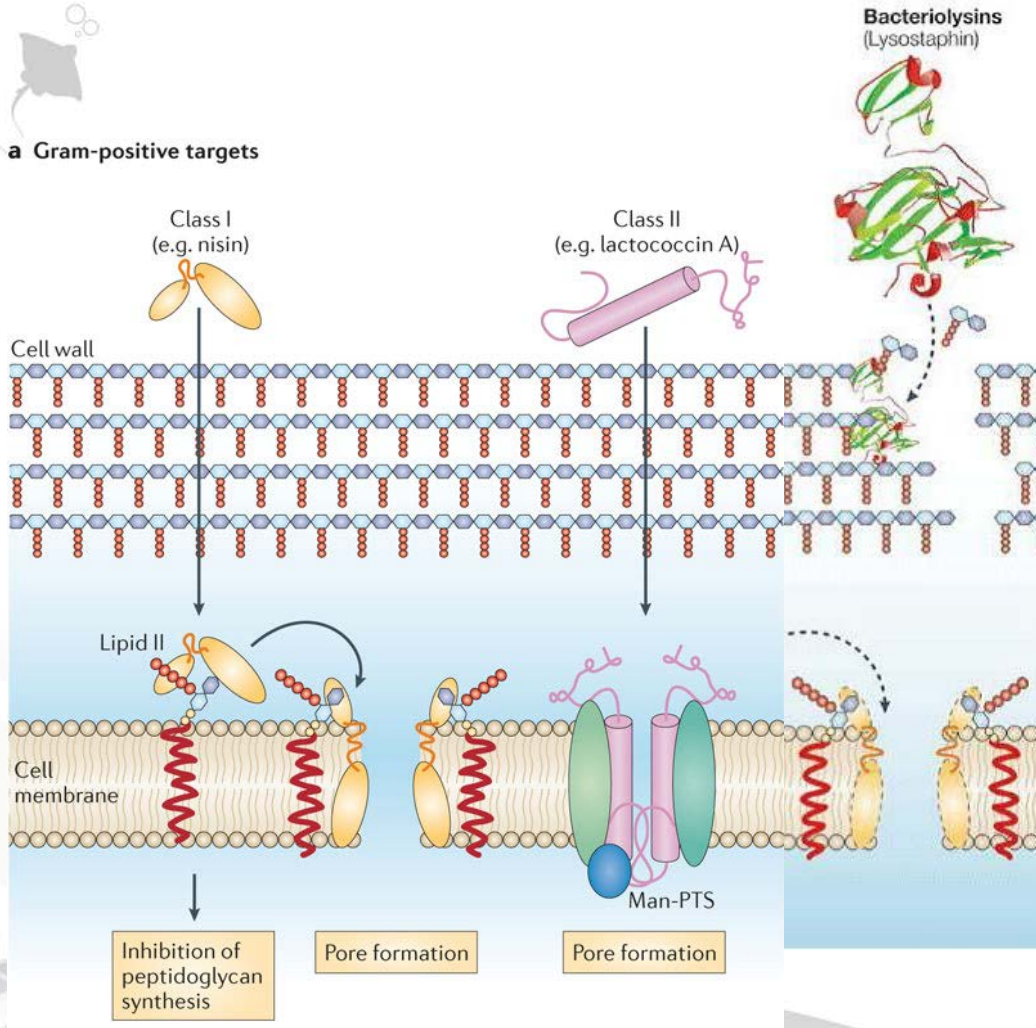


PROGETTO
Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola

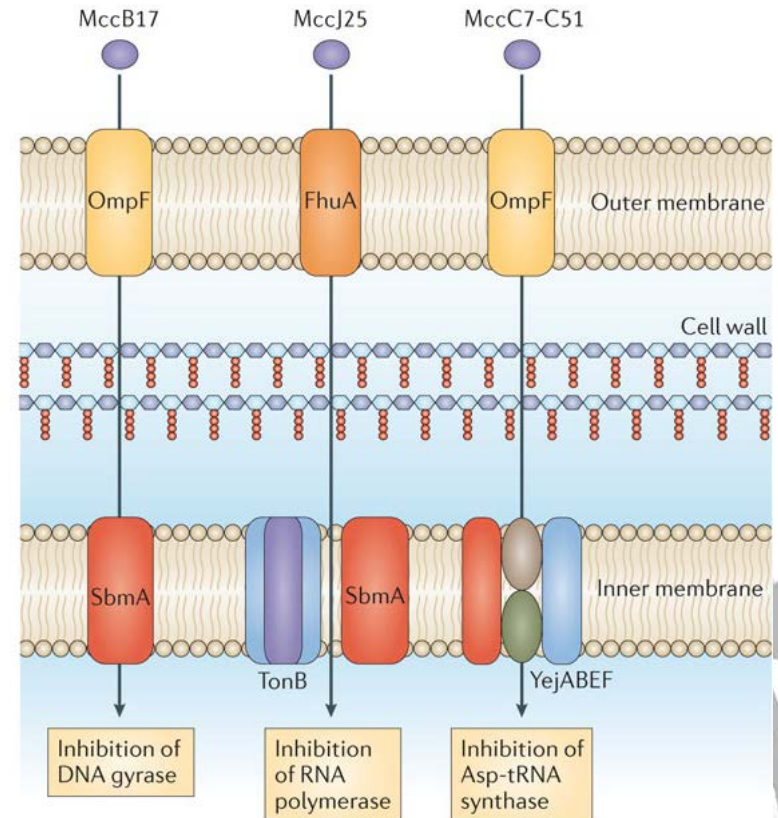


Impiego dei batteri lattici





b Gram-negative targets



Identificazione dei probiotici

Identificazione

- Sequenziamento 16s per identificazione di specie.
- PCR per discriminazione *L. casei* e *L. paracasei*.

Caratterizzazione

- PCR per batteriocine.
- PCR per ammine biogene e fattori di virulenza.

Capacità probiotiche

- Resistenza a pH e bile, capacità di adesione.
- Produzione *in vitro* di batteriocine.



Identificazione dei Lattobacilli

CONSERVED REGIONS: unspecific applications

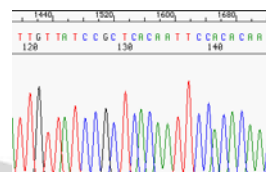
VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

16s rRNA gene

0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 bp



PCR per discriminazione
L. casei e *L. paracasei*
subsp. *paracasei*



Sequenziamento per
identificazione Lattobacilli



Caratterizzazione molecolare flora lattica

Categoria	Target	Gene
Batteriocine	Nisina	<i>nis</i>
	Enterocina L50AB	<i>entL50AB</i>
	Enterocina AS48	<i>entAS48</i>
	Enterocina A	<i>entA</i>
	Enterocina B	<i>entB</i>
	Enterocina P	<i>entP</i>
	Lantibiotico M	<i>lanM</i>
	Lantibiotico B	<i>lanB</i>
	Lantibiotico C	<i>lanC</i>
Fattori di virulenza ed ammine biogene	Gelatinasi	<i>gelE</i>
	Proteina enterococcica di superficie	<i>esp</i>
	Collagene di adesione	<i>ace</i>
	Istidina decarbossilasi	<i>hdc1</i>
	Antigene per l'endocardite	<i>efaA</i>
	Tirosina decarbossilasi	<i>tdc</i>
	Ornitina decarbossilasi	<i>odc</i>
	Citolisina	<i>cylA</i>
	Ialuronidasi	<i>hyl</i>
	Fattore di aggregazione	<i>asa1</i>
	Istidina decarbossilasi	<i>hdc2</i>

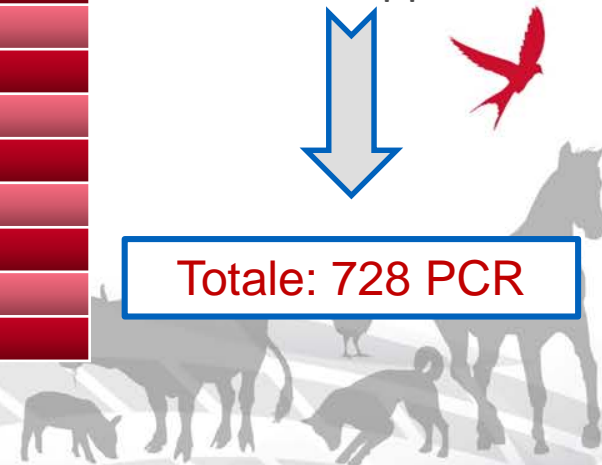
- 5 PCR simplex
- 3 multiplex PCR



91 ceppi



Totale: 728 PCR



Capacità probiotiche

- **Resistenza a pH: 2, 2.5, 3.0.**

$$\% \text{ Sopravvivenza} = \frac{\log \text{UFC}_{\text{pH}x}}{\log \text{UFC}_{\text{pH}6,2}} \times 100$$

- **Resistenza alla bile: 0.3%, 0.5%, 1%.**

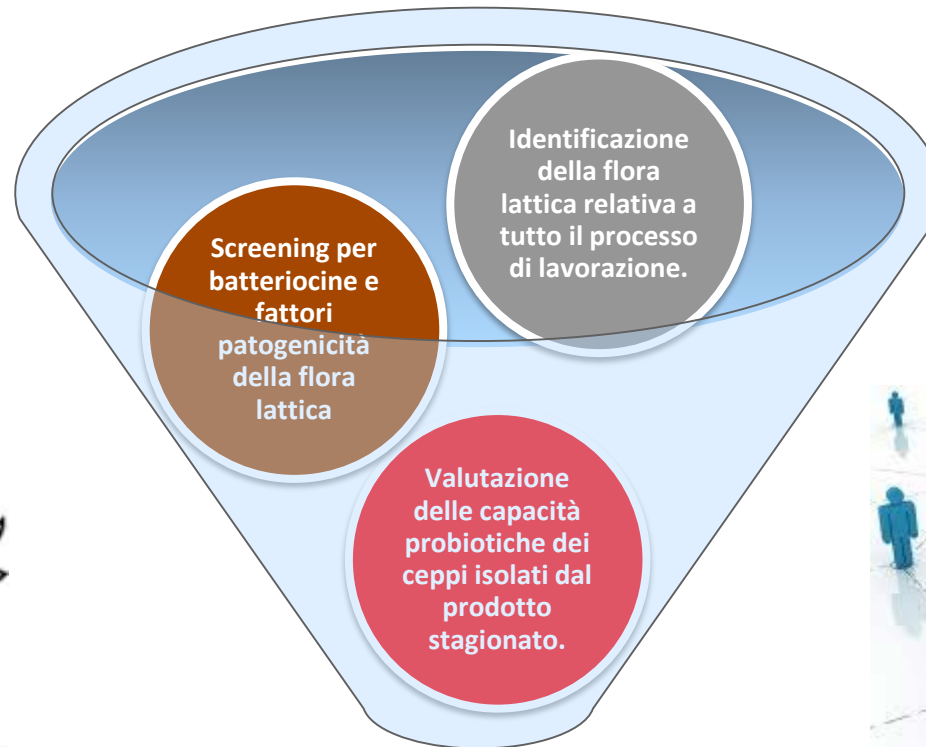
$$\% \text{ Sopravvivenza} = \frac{\text{OD}_x}{\text{OD}_{\text{CTR-}}} \times 100$$

- **Capacità di adesione: monostrato di 14gg di cellule Caco-2.**

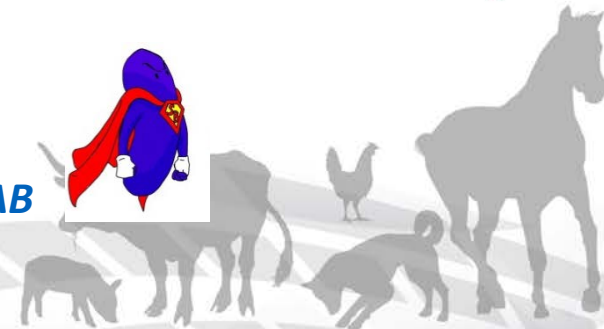
$$\% \text{ Adesione} = \frac{\text{UFC}_{\text{adesi}}}{\text{UFC}_{\text{inoculo}}} \times 100$$

- **Produzione *in vitro* di batteriocine: Deferred Antagonism Test.**

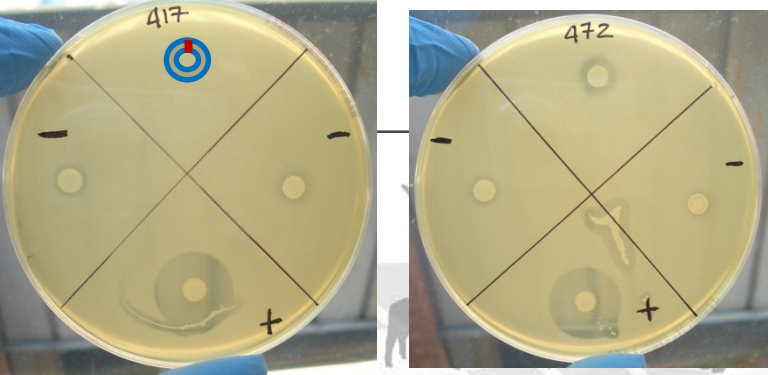
...chi cerca trova...



L. paracasei subsp. *paracasei* entB
L. paracasei subsp. *paracasei* entL50AB



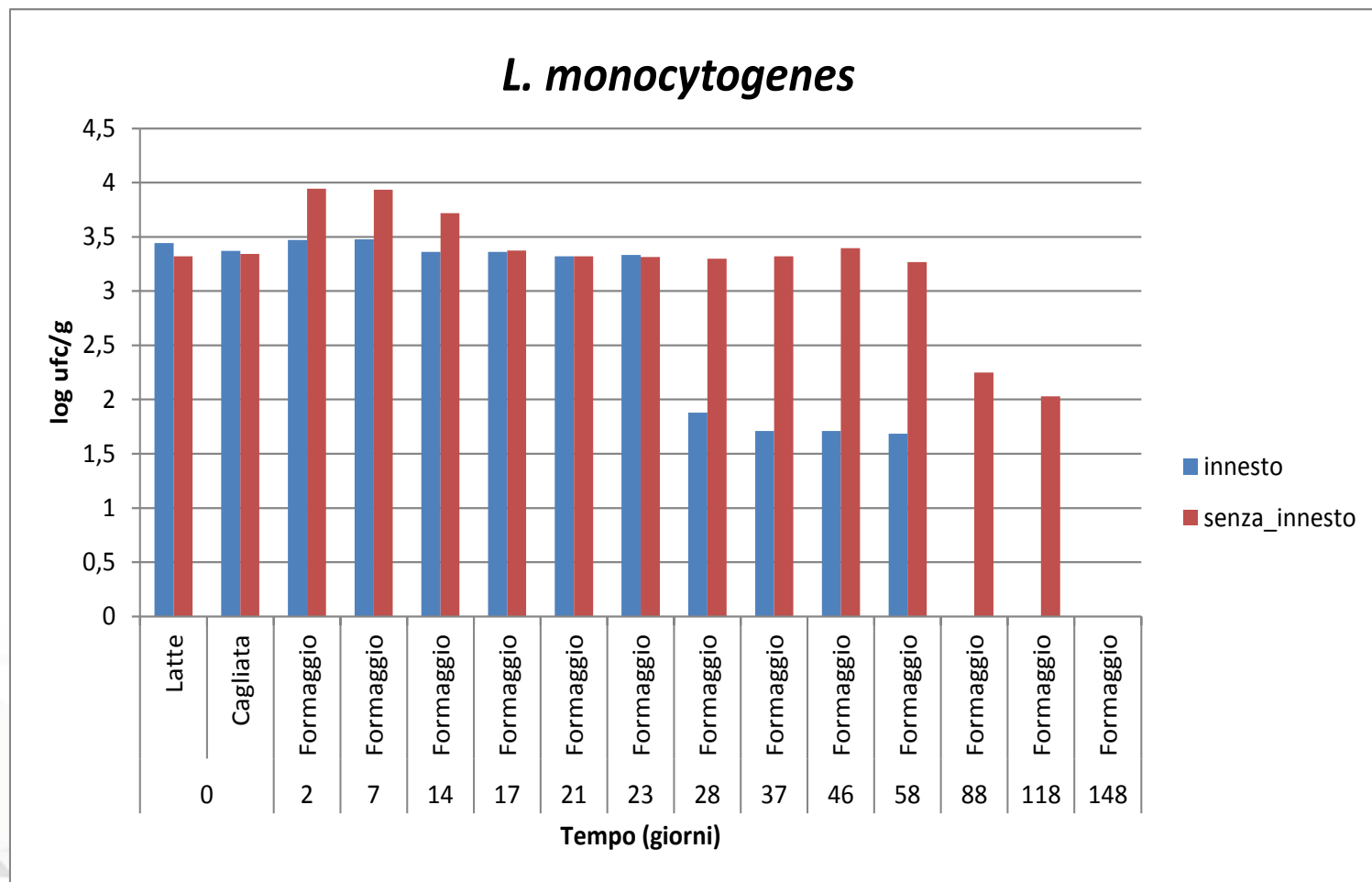
Caratteristiche dei ceppi selezionati

ID	LAB species	Ripening period (days)	Gene for bacteriocin production	pH resistance (%)		Bile resistance (%)			Adhesion activity (%)	Deferred Antagonism Test Inhibition activity (mm)
				2.5	3	0.3	0.5	1		
				ATCC393*	<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	0		
417	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	121	<i>entB</i>	0	95.44	80.23	45.87	16.32	0.032	2,5
472	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	150	<i>entLA50AB</i>	33.09	100	36.69	18.81	8.34	0.08	2,5
ATCC11454*	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	<i>nis</i>							8

*reference strain used as positive control (CTR+)



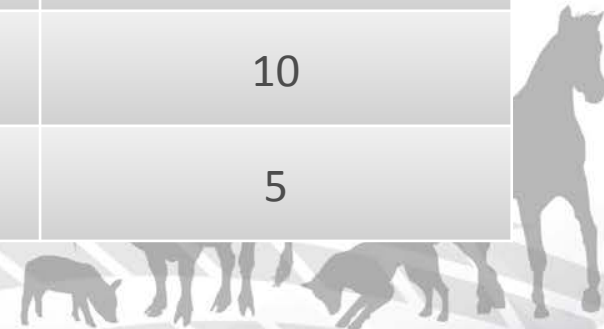
Numerazione *L. monocytogenes* produzione sperimentale



...non solo Lattobacilli...

E. faecium vs L. monocytogenes

ID	Ripening period (days)	Gene for bacteriocin production	Deferred Antagonism Test (mm)
418 A	121	<i>entP</i>	10
418 B	121	<i>entP</i>	10
419 A	121	<i>entL50AB</i>	8
435 B	121	<i>entB</i>	6
464 A	150	<i>entL50AB</i>	4
473 A	150	<i>entL50AB</i>	10
490 B	150	<i>entL50AB</i>	5



assessment OF PROBIotic activity OF Lactic acid Bacteria FOR safer and HEALTHier CHEESE PRODUCTIONS



 *Listeria monocytogenes*
National Reference Laboratory

Arianna Boni¹, Giuseppe Aprea^{1*}, Alessandra Alessiani², Lorena Sacchini², Gabriella Centorotola¹, Diana Neri¹, Francesco Pomilio¹, Elisabetta Di Giannatale², Giacomo Migliorati¹
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Teramo, Italy ¹Hygiene in Food Technology and Animal Feeds ²Bacteriology and Hygiene in the production of milk and dairy products *Corresponding author: g.aprea@izs.it

... e grazie a

Dott. Alessiani Alessandra
Dott. Aprea Giuseppe
Dott. Boni Arianna
Dott. Centorotola Gabriella
Dott. D'Angelantonio Daniela
Dott. Di Giannatale Elisabetta
Dott. Migliorati Giacomo
Dott. Neri Diana
Dott. Pomilio Francesco
Dott. Sperandii Anna Franca
Dott. Tucci Patrizia



Grazie per
l'attenzione!

