

IZS

T E R A M O

/

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

IZS AM 04/23 RC

“Miglioramento delle performance dei metodi di analisi utilizzati per la ricerca di *Listeria monocytogenes* in alimenti e tamponi provenienti da ambienti di produzione degli alimenti”

Gabriella Centorotola – Franca Rossi

- La presenza di *Lm* negli alimenti (soprattutto RTE) è un importante fattore di rischio per la sicurezza alimentare (listeriosi).
- Nell'UE, la **ISO 11290-1:2017** è il metodo di riferimento per la ricerca ed isolamento di *Lm* da colture (brodi) di pre-aricchimento e arricchimento, con successiva conferma e identificazione degli isolati.

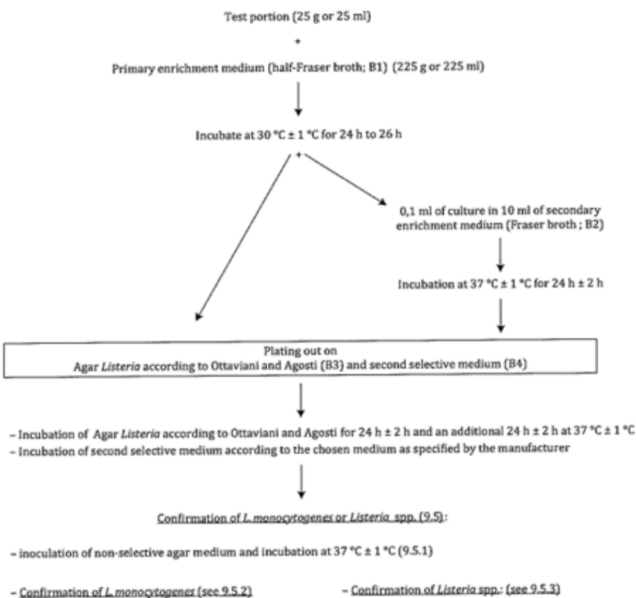
- Diversi studi hanno sottolineato alcuni limiti della ISO 11290-1:2017:

- ❖ rilevazione dei soli ceppi vivi, vitali e coltivabili, senza informazioni su forme vitali non coltivabili (VBNC) di *Lm*
- ❖ possibile competizione tra i diversi ceppi di *Lm* durante le fasi colturali, con mancato/ridotto sviluppo di ceppi presenti ed appartenenti a specifici sierogruppi e clonal complex (CC)
- ❖ difficoltà nel rilevare tutti i ceppi di *Lm* presenti in un campione (soprattutto in matrici sottoposte a stress termici, chimici o caratterizzati da elevata flora microbica endogena), aspetto fondamentale durante le indagini di focolaio

ISO 11290-1:2017(E)

Annex A (normative)

Diagram of procedure



«Miglioramento delle performance dei metodi di analisi utilizzati per la ricerca di *Listeria monocytogenes* in alimenti e tamponi provenienti da ambienti di produzione degli alimenti»

Codice progetto: IZS AM 04/23 RC

Responsabile scientifico: Gabriella Centorotola

Unità operativa	Ente appartenenza	Responsabile U.O.
U.O.1	IZS AM – Sede di Teramo Igiene e Tecnologie degli Alimenti (Laboratorio Nazionale di Riferimento per <i>Listeria monocytogenes</i>)	Dott.ssa Marina Torresi
U.O.2	IZS AM – Sezione di Campobasso Diagnostica Specialistica	Dott.ssa Franca Rossi
U.O.3	IZS AM- Sede di Teramo Centro di Referenza Nazionale per Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica	Dott. Cesare Cammà

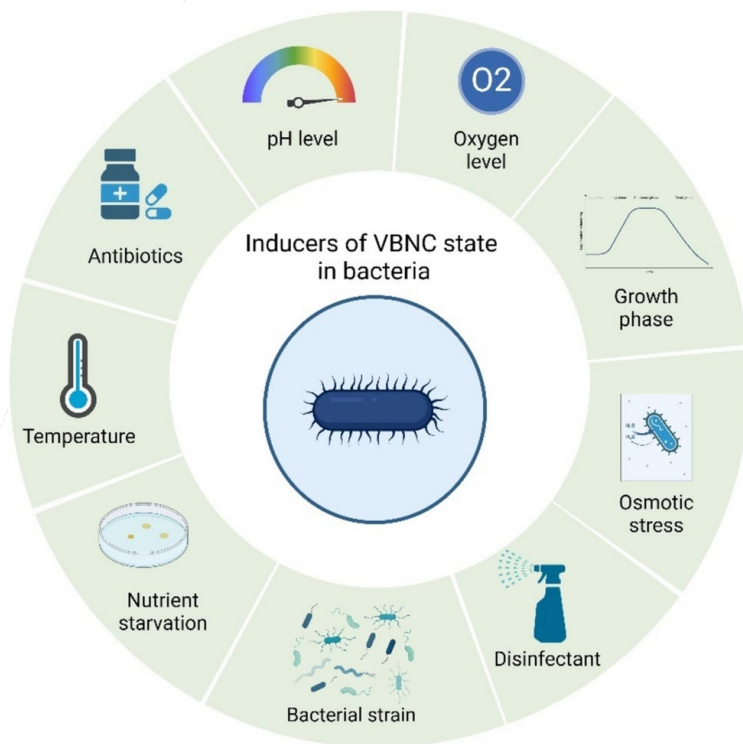
- **WP1:** studio e raccolta di dati sulla presenza e la prevalenza di ceppi di *Lm* nello stato vitale, VBNC e non vitale
- **WP2:** quantificazione del numero di *Lm* vitali e VBNC, induzione dello stato VBNC e *resuscitation* dei ceppi di *Lm*
- **WP3:** analisi di alimenti con i metodi messi a punto
- **WP4:** studio e raccolta dati relativi al tasso di recupero dei diversi ceppi di *Lm* in alimenti artificialmente contaminati
- **WP5:** comparazione delle cinetiche di moltiplicazione di ceppi di *Lm* in brodi di coltura diversi
- **WP6:** diffusione e valorizzazione dei risultati del progetto



Obiettivi del progetto IZS AM 04/23 RC :

- ✓ messa a punto di un metodo di analisi per la determinazione del numero di *Lm* vitali coltivabili, VBNC e non vitali;
- ✓ messa a punto di un metodo di analisi per la rilevazione qualitativa e quantitativa di ceppi di *Lm* appartenenti a diversi sierogruppi e CC nei brodi di pre-arricchimento;
- ✓ valutazione della performance dell'uso di brodi di pre-arricchimento diversi da Half-Fraser (ISO 11290-1:2017) per ottimizzare il metodo di ricerca di *Lm* negli alimenti e nei campioni prelevati negli ambienti di lavorazione degli alimenti;
- ✓ implementazione dei metodi messi a punto per l'analisi di campioni alimentari.

Raccolta e la valutazione della bibliografia e dei dati disponibili per redigere una review su una panoramica dettagliata riguardo quanto si conosce ad oggi sui fattori che inducono la forma VBNC in *Lm* e sui meccanismi molecolari coinvolti e sulle condizioni di *resuscitation*



Finalità:

Selezione di parametri e condizioni da testare nel progetto per indurre la forma VBNC e la *resuscitation*

Valutazione dei metodi di viability PCR (vPCR) disponibili, ovvero metodi di qPCR capaci di rilevare solo le cellule vitali del patogeno

Quantificazione del numero di cellule vitali e VBNC di *Lm*

- ✓ Sviluppo di un test di qPCR specie-specifico il più possibile inclusivo di diversi gruppi clonali da utilizzare nella vPCR
- ✓ Valutazione di primer già descritti in articoli scientifici, ma non sufficientemente inclusivi e alcuni perfino non specifici

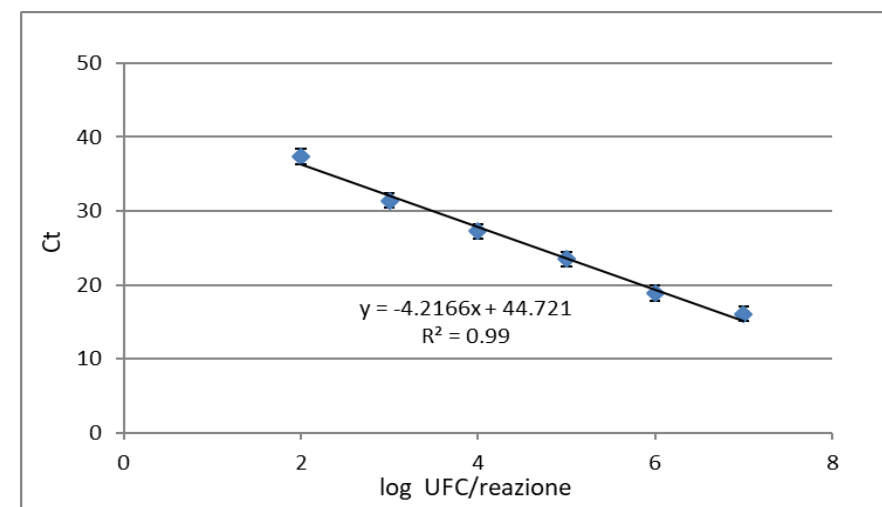
DISEGNO DI NUOVI PRIMER E SONDA

1. Scelta del gene target *inlA*
2. Scelta di sequenze rappresentative per la selezione dei possibili siti di appaiamento dei nuovi primer e sonda
3. Disegnati nuovi primer per il gene *inlA*
4. Idoneità dei nuovi primer e sonda dimostrata per i ceppi di studio

Identificativo ceppo <i>Lm</i>	Prodotto	Sierogruppo	CC	ST
Lm1	Wurstel di pollo	IIa	CC155	ST155
Lm2	Olive nere	IVb	CC1	ST1
Lm3	Mozzarella	IVb	CC2	ST2

Fasi della metodica vPCR:

- Preparazione di una sospensione di cellule di *Lm*
- Aggiunta di un intercalante del DNA capace di penetrare solo nelle cellule morte
- Incubazione al buio Lavaggio del pellet, estrazione del DNA e qPCR
- Calcolo cellule VBNC con vPCR



Condizione solo cellule vitali soddisfatta per colture di 4 h in BHI o TSAYE o demi-Fraser da colonia isolata. Esempio di curva di calibrazione con tre estratti separati per ogni diluizione decimale da solo cellule vive

Rilevamento cellule VBNC dopo stress: risospensione in soluzione di stress, vPCR e conta previo lavaggio delle cellule dopo una settimana di incubazione a 4°C

Sensibilità del test (LOD₉₅): 100 UFC/reazione di PCR
Anche per estratti da alimenti

Analisi della *resuscitation*:

- Induzione dello stato VBNC nelle condizioni selezionate
- Risospensione in volume di fisiologica 10 volte inferiore a quello della coltura
- Semina del concentrato e delle diluizioni su ALOA, BHI agar
- Incubazione del pellet in BHI per 24 h e semina su ALOA (metodo non quantitativo).

Analisi della presenza di *Lm* VBNC in alimenti RTE: Analisi di 51 campioni di alimenti reperiti dal commercio

Fasi: Omogeneizzazione in stomacher in demi-Fraser (25 g in 225 ml), prelievo di 10 ml di omogenato, centrifugazione, risospensione in 1 ml di fisiologica e trattamento con PMA (per alcuni alimenti è stato messo a punto un sistema di filtrazione per ottenere una sospensione cellulare trasparente alla luce), estrazione del DNA dal pellet ed esecuzione della vPCR – numerazione in parallelo con ISO 11290-2

WP4: studio e raccolta dati relativi al tasso di recupero dei diversi ceppi di *Lm* in alimenti artificialmente contaminati

- Prove su campioni **artificialmente contaminati** da *Lm* per la ricerca di diversi ceppi di *Lm* presenti nello stesso campione, in termini di sierogruppo e CC, a partire dal brodo di pre-arricchimento Half Fraser (HF):

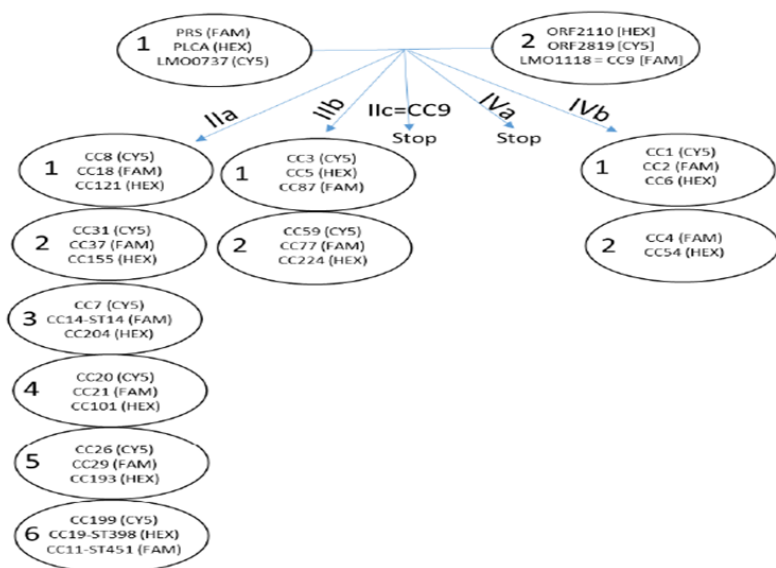
I campioni sono stati:

1. **artificialmente contaminati** con una mix di inoculo di due diversi ceppi *Lm* e considerando livelli di inoculo diversi per ogni ceppo
2. **processati in accordo alla ISO11290-1:2017** per la ricerca di *Lm*.
3. per ogni campione artificialmente contaminato è stato **estratto il DNA dal brodo di pre-arricchimento HF post incubazione**, in accordo al protocollo inviato da EURL-*Lm*.

Identificativo ceppo <i>Lm</i>	Matrice di isolamento	Prodotto	Sierogruppo	Clonal complex	Sequence type
Lm1	Carne	Wurstel di pollo	IIa	CC155	ST155
Lm2	Vegetali	Olive nere	IVb	CC1	ST1

Categoria	Tipologia di prodotto	Ceppi utilizzati e livello 1 di inoculo	Ceppi utilizzati e livello 2 di inoculo	Ceppi utilizzati e livello 3 di inoculo
Carne e derivati	Prosciutto cotto	Lm1+Lm2 50%+50%	Lm1+Lm2 70%+30%	Lm1+Lm2 30%+70%
Frutta e vegetali	Olive nere	Lm1+Lm2 50%+50%	Lm1+Lm2 70%+30%	Lm1+Lm2 30%+70%

- Prove su **campioni naturalmente contaminati** da *Lm* per la ricerca di diversi ceppi di presenti nello stesso campione, in termini di sierogruppo e CC, a partire dal brodo di pre-arricchimento Half Fraser (HF).
1. Sono stati collezionati in Reparto campioni in cui *Lm* era naturalmente presente (rilevata in accordo alla ISO11290-1:2017).
 2. Per ogni matrice naturalmente contaminata è stato **estratto il DNA dal brodo di pre-arricchimento HF post incubazione**, in accordo al protocollo inviato da EURL-*Lm*.
 3. Per questi campioni erano state precedentemente isolate e confermate le colonie di *Lm*, processate poi tramite WGS.



Tutti i campioni di DNA estratti sono stati analizzati tramite:

1. ANSES/LSAliments/LSA-INS-1517-Version 03. GenoListeria Multiplex: Identification by multiplex **real time PCR** of 30 major clonal complexes of *Listeria monocytogenes* strains” per la ricerca dei diversi cloni di *Lm*.
2. **Digital PCR** per la verifica della concentrazione dei diversi cloni di *Lm*.

WP5: comparazione delle cinetiche di moltiplicazione di ceppi di *Lm* in brodi di coltura diversi

- Prove su campioni artificialmente contaminati con *Lm* utilizzando diversi brodi di pre-aricchimento, alternativi al brodo Half Fraser

Fasi analitiche:

1. scelta dei brodi di pre-aricchimento alternativi e scelta delle diverse opzioni,
2. scelta delle matrici da contaminare,
3. scelta dei ceppi di *Lm*,
4. preparazione degli inoculi,
5. contaminazione delle matrici,
6. analisi dei campioni (ISO 11290-1;2017),
7. gestione dei risultati.

Opzione	Brodo di pre-aricchimento	Temperatura e tempo di incubazione	Volume di inoculo nel brodo di arricchimento Fraser
Opz_1	Half Fraser (Merck) ISO11290-1:2017	30° C 24-26h	0,1 ml
Opz_3	UVM1 (IZSAM)	30° C 48h	0,2 ml
Opz_4	LESS Plus Medium (NEOGEN)	30° C 22-26h	0,1 ml
Opz_5	LSB (Biorad)	30° C 22-26h	0,1 ml
Opz_6	24LEB (Thermo Scientific)	37° C 22-26h	0,1 ml
Opz_7	Half Fraser (Merck)	30° C 26-28h	1 ml
Opz_8	Half Fraser (Merck)	37° C 26-28h	1 ml
Opz_9	Modified Half Fraser Dupont (Merck)	30° C 26-28h	1 ml
Opz_10	Modified Half Fraser Dupont (Merck)	37° C 26-28h	1 ml
Opz_11 (Bianco)	Half Fraser (Merck) ISO11290-1:2017	30° C 24-26h	0,1 ml
Opz_12	Half Fraser (IZSAM) ISO11290-1:2017	30° C 24-26h	0,1 ml

Identificativo ceppo Lm	Prodotto	Sierogruppo	Clonal complex	Sequence type
Lm1	Wurstel di pollo	IIa	CC155	ST155
Lm2	Olive nere	IVb	CC1	ST1
Lm3	Mozzarella	IVb	CC2	ST2

Identificativo campione	Categoria	Tipologia di prodotto	Ceppo inoculato
ID 2098	Carne e derivati	Wurstel di pollo	Lm1
ID 2103	Carne e derivati	Salame	Lm1
ID 2105	Carne e derivati	Prosciutto cotto	Lm1
ID 2471	Frutta e vegetali	Olive	Lm2
ID 2472	Frutta e vegetali	Insalata	Lm2
ID 2481	Frutta e vegetali	Melone	Lm2
ID 3251	Latte e derivati	Mozzarella	Lm3
ID 3252	Latte e derivati	Gelato	Lm3
ID 3254	Latte e derivati	Formaggio fresco	Lm3
ID 3256	Latte e derivati	Gorgonzola	Lm3

- ✓ Ogni campione è stato analizzato per la ricerca di *L. monocytogenes* (ISO 11290-1:2017).
- ✓ Per ciascun brodo di pre-arricchimento di ciascuna opzione considerata sono state eseguite delle prove di semi-quantificazione (tecnica "drop plate").

IZS

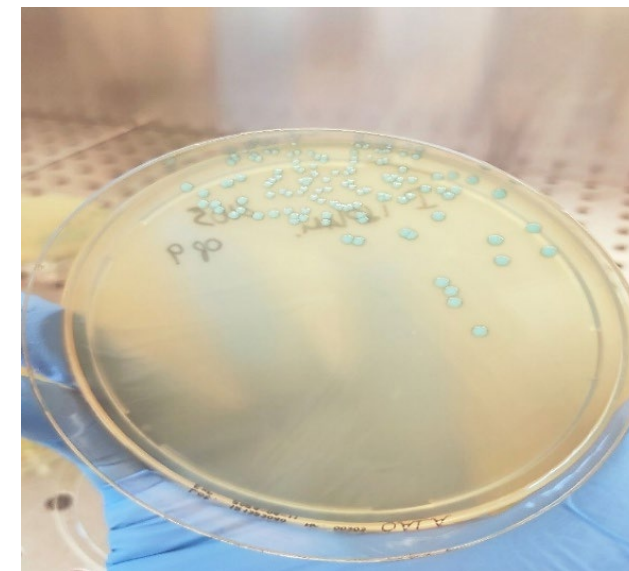
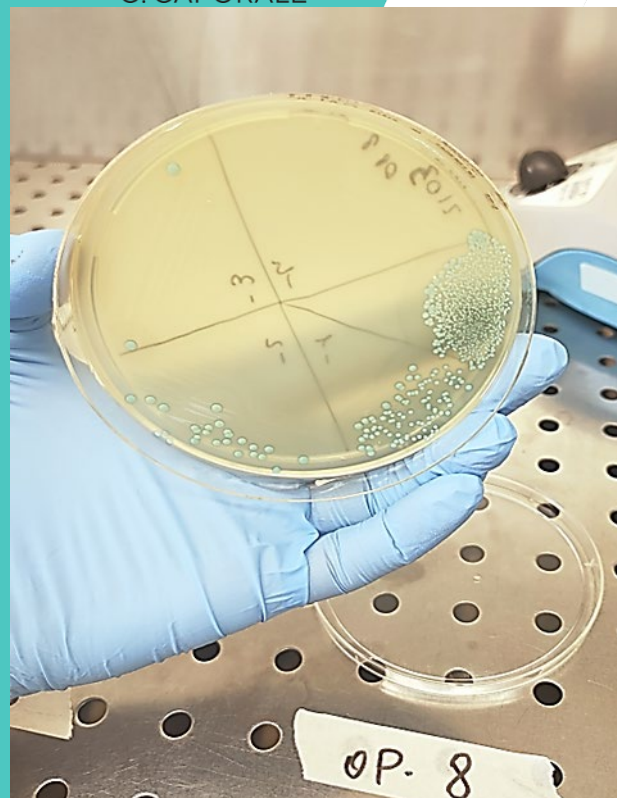
T E R A M O

/

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

MATERIALI E METODI: WP5

- Sono state effettuate le semine dei brodi di pre-arricchimento e dei brodi di secondo arricchimento su 4 settori delle piastre di ALOA. Dopo incubazione, sono state osservate le colonie, annotando fino a quale dei 4 settori è stata riscontrata crescita di *Lm*.



- Per ciascun brodo di pre-arricchimento di ciascuna opzione considerata sono state eseguite delle prove di semi-quantificazione (tecnica "drop plate") su ALOA. Dopo incubazione, è stata eseguita la conta delle colonie di *Lm* nei due settori contenenti da 1 a 50 colonie.

La diffusione in ambito scientifico dei risultati ottenuti è stata e verrà esplicata attraverso pubblicazioni su riviste scientifiche e presentazioni/poster in convegni/seminari.



applied sciences

<https://doi.org/10.3390/app15031454>



Review

Latest Developments of Research on the Viable Non-Culturable State of *L. monocytogenes* and Implications for Food Safety

Franca Rossi ¹, Palmiro Poltronieri ^{2,*}, Francesco Pomilio ¹ and Gabriella Centorotola ¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise (IZSAM), Campo Boario, 64100 Teramo, Italy; f.rossi@izs.it (F.R.); f.pomilio@izs.it (F.P.); g.centorotola@izs.it (G.C.)

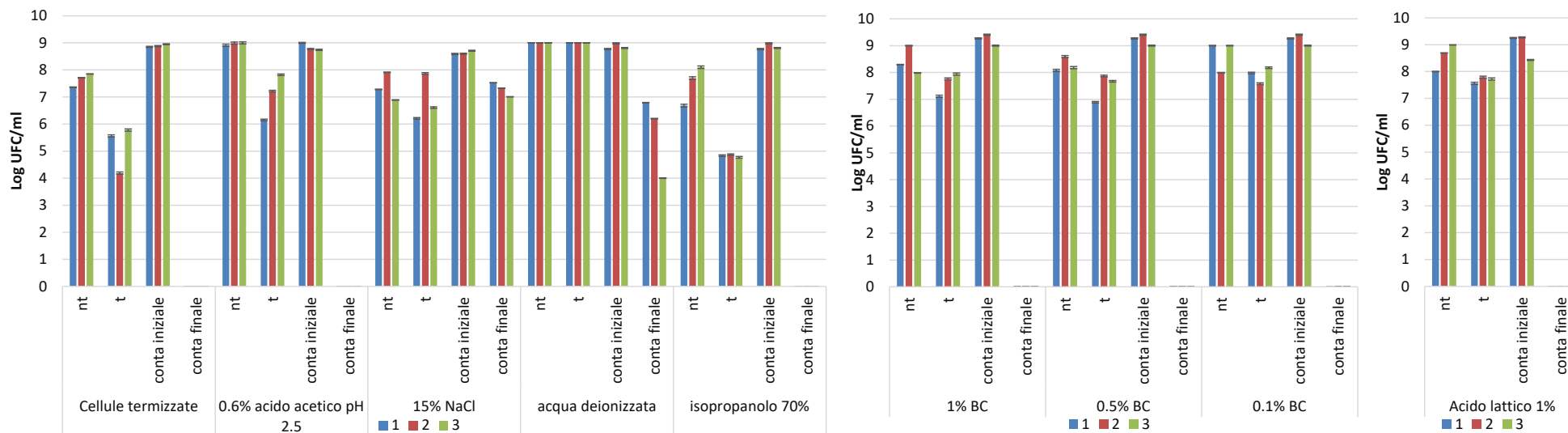
² Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (CNR-ISPA), 73100 Lecce, Italy

* Correspondence: palmiro.poltronieri@ispa.cnr.it

Featured Application: This review article aims to collect updated knowledge on the conditions that induce the viable non-culturable (VBNC) state in the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, obtain indications on practices that can prevent the occurrence of this form of the pathogen in food, and identify aspects that necessitate further investigation.

- Presentazione orale (relatore Centorotola) da titolo "ISO/TC 34/SC 9/WG 32. ISO 11290-1, ricerca di *Listeria monocytogenes*: esperienza dell'IZSAM nell'ottimizzazione della fase di pre-arricchimento" per la giornata di studio "Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes* (LNR Lm)" (Teramo, 13/05/2025).
- Abstract/poster "Innovative methods for the detection and quantification of *Listeria monocytogenes* clones in food matrices", Giovanna Alessia Robbe, Gabriella Centorotola, Francesco Pomilio, Marina Torresi, Alberto Vergara. Annual Meeting 2025 del Corso di Dottorato in Scienze Mediche Veterinarie, Sanità Pubblica e Benessere Animale (Teramo, 08/09/2025).
- Presentazione orale (relatori Centorotola/Rossi) «Sviluppo e ottimizzazione di metodiche analitiche per la ricerca di differenti cloni e cellule VBNC di *Listeria monocytogenes*» alla giornata di studio "Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes* (LNR Lm)" (Teramo 23/06/2026).

Esposizione a diversi fattori di stress



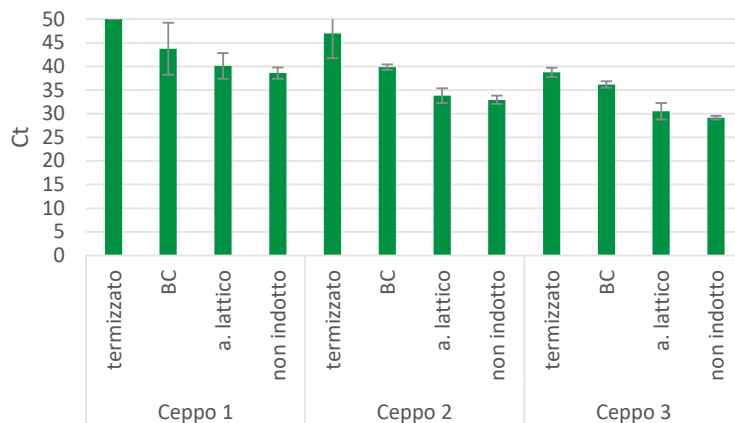
NT ; cellule non trattate con PMA (cellule totali)

T ; cellule trattate con PMA (cellule vitali)

1, 2, 3; ceppi 1, 2 e 3

- ✓ Differenza statisticamente significativa tra cellule vitali e segnale residuo da cellule morte (test t di Student, $p \leq 0.05$) per acido acetico, BC a tutte le concentrazioni e acido lattico, condizioni che inducono la forma VBNC
- ✓ Alcune differenze tra i ceppi

Induzione della forma VBNC con acido lattico 1% e BC 1% su cellule in fase esponenziale



- ✓ Per tutti ceppi l'acido lattico induce la forma VBNC ($p \leq 0.05$)
- ✓ Il BC la induce solo nel ceppo 3 in maniera statisticamente significativa anche se la media del Ct è inferiore rispetto a quella delle cellule termizzate

Prove di *resuscitation*

Su nessuno dei due terreni è stata osservata la crescita di colonie neanche dopo 72 h, indicando che si dovrà indagare ulteriormente sulla capacità delle forme VBNC di *Lm* di riacquisire la coltivabilità *in vitro*.

Ricerca *Lm* VBNC in alimenti:

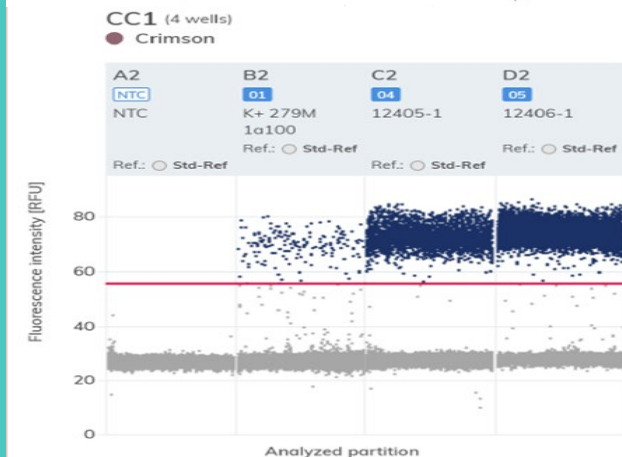
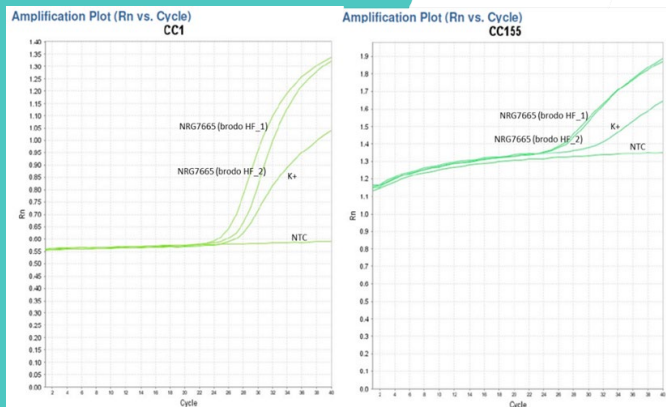
In nessuno dei 51 campioni analizzati è stata rilevata *Lm* coltivabile né VBNC mediante numerazione (ISO 11290-2:2017), ma sarebbe utile estendere l'analisi a un vasto numero di campioni.

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO



RISULTATI: WP4

Risultati ottenuti dalle prove eseguite su campioni artificialmente contaminati con *Lm*

Id. campione	Prodotto	Livello di inoculo	ISO 11290-1	real time PCR da colonie (da HF)	real time PCR da colonie (da Fraser)	real time PCR (da HF)	dPCR (da HF)
ID 7665/1	prosciutto cotto	1	<i>Lm</i> rilevata in 25g	1/5 CC1 + 4/5 CC155	3/5 CC1 + 2/5 CC155	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (2398 cp/μl); CC155 (2,65x10 ⁴ cp/μl)
ID 7665/2	prosciutto cotto	1	<i>Lm</i> rilevata in 25g	1/5 CC1 + 4/5 CC155	1/5 CC1 + 4/5 CC155	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (444 cp/μl); CC155 (2,65x10 ³ cp/μl)
ID 8753/1	olive nere	1	<i>Lm</i> rilevata in 25g	5/5 CC155	5/5 CC155	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (1,42x10 ⁴ cp/μl); CC155 (8,31x10 ⁵ cp/μl)
ID 8753/2	olive nere	1	<i>Lm</i> rilevata in 25g	5/5 CC155	5/5 CC155	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (1,8x10 ⁴ cp/μl); CC155 (9,55x10 ⁵ cp/μl)
ID 12405/1	prosciutto cotto	2	<i>Lm</i> rilevata in 25g	2/5 CC1 + 3/5 CC155	3/5 CC1 + 2/5 CC155	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (7x10 ⁴ cp/μl); CC155 (3,9x10 ⁵ cp/μl)
ID 12405/2	prosciutto cotto	2	<i>Lm</i> rilevata in 25g	4/5 CC1 + 1/5 CC155	3/5 CC1 + 2/5 CC155	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (2,07x10 ⁴ cp/μl); CC155 (3,0x10 ⁵ cp/μl)
ID 21977/1	olive nere	2	<i>Lm</i> rilevata in 25g	5/5 CC155	3/5 CC155 + 2/5 CC1	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (17,45 cp/μl); CC155 (387,8 cp/μl)
ID 21977/2	olive nere	2	<i>Lm</i> rilevata in 25g	5/5 CC155	4/5 CC155 + 1/5 CC1	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (16,79 cp/μl); CC155 (250 cp/μl)
ID 12406/1	prosciutto cotto	3	<i>Lm</i> rilevata in 25g	5/5 CC1	5/5 CC1	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (2,35x10 ⁵ cp/μl); CC155 (2,89x10 ⁴ cp/μl)
ID 12406/2	prosciutto cotto	3	<i>Lm</i> rilevata in 25g	4/5 CC1 + 1/5 CC155	5/5 CC1	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (3,15x10 ⁵ cp/μl); CC155 (2,70x10 ⁴ cp/μl)
ID 21978/1	olive nere	3	<i>Lm</i> rilevata in 25g	2/5 CC155 + 3/5 CC1	1/5 CC155 + 4/5 CC1	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (4,667 cp/μl); CC155 (3,017 cp/μl)
ID 21978/2	olive nere	3	<i>Lm</i> rilevata in 25g	2/5 CC155 + 3/5 CC1	1/5 CC155 + 4/5 CC1	Ila CC155; IVb CC1	CC1 (1,699 cp/μl); CC155 (1,051 cp/μl)

Risultati ottenuti dalle prove eseguite su campioni naturalmente contaminati con *Lm*

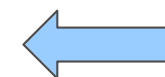
Id. campione	Matrice	ISO 11290-1	CC da colonie isolate e sequenziate	real time PCR (da HF)	dPCR (da HF)
ID 8760/1	Carne (coppa di testa)	<i>Lm</i> rilevata in 25g	10/10 CC2	IVb CC2	CC2 (1382,7 cp/μl)
ID 8760/2	Carne (coppa di testa)	<i>Lm</i> rilevata in 25g	10/10 CC2	IVb CC2	CC2 (1377,0 cp/μl)
ID 14854/1	Tampone ambientale (FCS)	<i>Lm</i> rilevata	1/1 CC155	Ila CC9+ Ila CC155	CC9 (647,5 cp/μl); CC155 (1168 cp/μl)
ID 14854/2	Tampone ambientale (NFCS)	<i>Lm</i> rilevata	1/1 CC155	Ila CC9+ Ila CC155	CC9 (890,9 cp/μl); CC155 (1184,4 cp/μl)

RISULTATI: WP5

Risultati della crescita di *L. monocytogenes* per la semina nei quattro quadranti delle piastre di ALOA dei brodi di pre-arricchimento e dei brodi di arricchimento secondario per le matrici analizzate per le 11 opzioni.

Opzione	ID 2098	ID 2103	ID 2105	ID 2471	ID 2472	ID 2481	ID 3251	ID 3252	ID 3254	ID 3256
Opz_1	1	1	1	2	1	1	2	1	0	1
Opz_3	4	0	0	4	4	4	1	4	1	0
Opz_4	1	1	1	1	1	4	2	2	0	2
Opz_5	2	1	1	1	3	1	1	3	0	2
Opz_6	3	1	2	1	4	1	4	2	3	3
Opz_7	1	1	1	1	1	4	1	2	0	1
Opz_8	2	3	1	1	4	1	3	3	1	3
Opz_9	4	1	2	1	2	2	1	2	0	2
Opz_10	3	1	1	4	4	2	2	3	0	1
Opz_11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opz_12	1	1	4	1	1	1	1	0	0	3

Primo step:
brodo pre-
arricchimento



Secondo step:
brodo
arricchimento
secondario



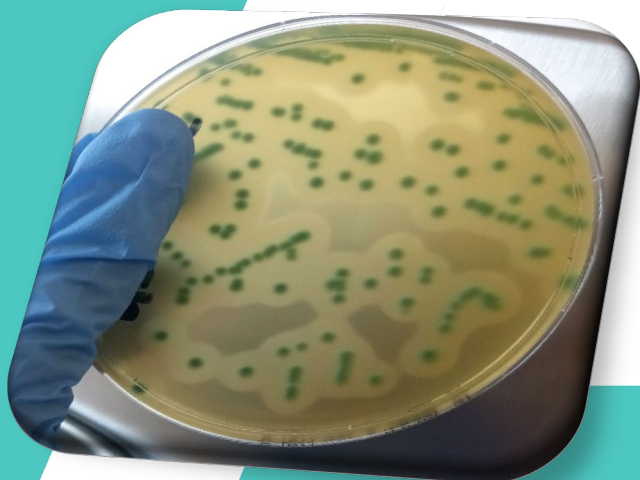
Opzione	ID 2098	ID 2103	ID 2105	ID 2471	ID 2472	ID 2481	ID 3251	ID 3252	ID 3254	ID 3256
Opz_1	4	4	4	4	4	4	4	3	0	2
Opz_3	4	3	0	4	4	0	1	3	0	0
Opz_4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4
Opz_5	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4
Opz_6	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3
Opz_7	4	4	3	3	4	4	4	4	2	4
Opz_8	4	3	3	3	4	4	4	4	1	4
Opz_9	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Opz_10	4	4	2	4	4	4	4	4	3	4
Opz_11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Opz_12	4	2	3	4	4	4	2	0	0	3

IZS

T E R A M O

/

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



RISULTATI: WP5

Risultati delle prove semi-quantitative brodi di pre-arricchiamento ($\log_{10}$ ufc/ml)

Opzione	ID 2098	ID 2103	ID 2105	ID 2471	ID 2472	ID 2481	ID 3251	ID 3252	ID 3254	ID 3256
Opz_1	3,5	1,8	3,3	2,4	2,7	2,6	3	3,1	/	1,6
Opz_3	7,6	/	/	8,1	7,5	/	2,4	7,6	2,2	/
Opz_4	4,2	2,0	2,7	3,2	3,5	2,6	3,2	3,1	/	2,6
Opz_5	4,0	3,0	3,1	2,7	3,7	2,7	4,0	4,4	/	3,5
Opz_6	5,2	2,7	4,1	4,5	6,2	5,2	4,8	5,2	4,2	5,3
Opz_7	3,7	2,0	3,4	3,4	3,5	3,2	3,3	3,6	/	1,8
Opz_8	5,3	4,4	3,7	4,1	6,1	4,5	4,9	6,4	1,6	6,5
Opz_9	5,1	3,5	3,2	4,0	4,7	3,0	3,6	5,0	/	3,4
Opz_10	3,7	3,7	3,7	6,4	6,4	5,7	5,7	6,5	/	3,7
Opz_11	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Opz_12	5,3	1,6	3,7	/	4,1	3,2	2,0	/	/	3,5

Il progetto ha dimostrato che:

- ✓ l'esposizione agli **acidi acetico e lattico** e al **BC** inducono la forma VBNC di *Lm*
- ✓ **modifiche ai brodi** e alle condizioni di pre-arricchimento (tempo, temperatura, volume di trasferimento) migliorerebbero il recupero e la concentrazione di *Lm* rispetto all'HF (ISO 11290-1:2017).
- ✓ la **real time PCR** per l'identificazione rapida dei sierogruppi e dei principali CC da brodo HF e l'**ottimizzazione dei saggi in dPCR** rappresenterebbero strumenti efficaci, per la sorveglianza, la gestione del rischio e le indagini sui focolai.

I metodi sviluppati nel progetto e i dati ottenuti saranno utili per:

- ✓ **collaborare con l'EURL-*Lm*** al fine di validarli.
- ✓ **migliorare la sensibilità, la rapidità e l'affidabilità della rilevazione di *Lm*** lungo la filiera alimentare.
- ✓ **Proseguire con ulteriori studi per monitorare la crescita di tutti i diversi cloni di *Lm*.**
- ✓ **garantire l'ottimizzazione dei protocolli** estendendoli anche agli ulteriori sierogruppi e CCs di *Lm* maggiormente rilevanti in ambito di sicurezza alimentare e casi di focolaio.



IZS

T E R A M O

/

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

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!