

IMPIEGO DEL METODO “VIDAS-LMO” PER LA RICERCA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN PRODOTTI CARNEI E LATTIERO-CASEARI

Bonardi S., Lucidi L., Paris A., Brindani F.¹

Introduzione

Nel presente lavoro si procede al confronto tra metodiche tradizionali atte all'isolamento di *Listeria monocytogenes*, caratterizzate da tempi piuttosto lunghi per lo svolgimento delle analisi, e la procedura automatizzata “VIDAS-LMO” (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) basata sul metodo ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) e richiedente tempi più brevi per rilevare o meno la presenza del patogeno.

Come è noto, l'isolamento di *L. monocytogenes* da diversi prodotti alimentari è un evento abbastanza frequente. Un'indagine svolta da Messi *et al.* (2000) ha messo in evidenza come l'8% di 494 campioni di prodotti lattiero-caseari, il 15% di 509 campioni di carni crude e di prodotti carnei ed il 7,6% di 183 campioni di pesci e prodotti ittici risultavano contaminati dal microrganismo. Diverse ricerche hanno dimostrato la presenza di *L. monocytogenes* in formaggi a pasta molle (Loncarevic *et al.*, 1995; Pinto e Reali, 1996), salsicce fresche (Messi *et al.*, 2000), salami stagionati (Pezzotti *et al.*, 2000) e prodotti ittici (Farber, 2000; Rorvik *et al.*, 2000). Non stupisce, pertanto, la frequente segnalazione di focolai di listeriosi umana di origine alimentare, descritti anche di recente in diversi paesi (Aureli *et al.*, 2000; Lyytikäinen *et al.*, 2000; Tham *et al.*, 2000).

Per questo motivo si è costantemente alla ricerca di un metodo analitico caratterizzato da sensibilità e specificità elevate, ma anche capace di rilevare la presenza di *L. monocytogenes* in tempi relativamente brevi. Obiettivo di questa indagine è pertanto il confronto tra metodi analitici convenzionali, quali il metodo ISO 10560 per il latte ed i prodotti lattiero-caseari e la procedura basata sul doppio arricchimento nei brodi LEB UVM I e LEB UVM II per le matrici carnee, con l'analisi immuno-enzimatica eseguita con il kit VIDAS-LMO per l'isolamento di *L. monocytogenes* da prodotti alimentari naturalmente contaminati.

Materiali e metodi

Nel periodo compreso tra Agosto 2000 e Maggio 2001 si sono analizzati complessivamente 125 campioni, così suddivisi: 30 campioni di mozzarella, acquistati presso vari punti vendita, 50 campioni di ricotta vaccina fresca tradizionale, di cui 36 reperiti direttamente presso i caseifici di produzione e 14 da diversi banchi vendita,

¹ Dipartimento di Salute Animale – Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale – Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Parma.

e 45 salsicce di carne suina provenienti da alcuni laboratori artigianali distribuiti in provincia di Parma. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di *L. monocytogenes* secondo metodiche tradizionali e secondo la procedura VIDAS-LMO.

I prodotti lattiero-caseari sono stati analizzati secondo il metodo ISO 10560: 25 grammi di campione sono stati addizionati a 225 ml di brodo Tryptone Soya con estratto di lievito (TSYEB) supplementato con acriflavina idrocloridrato (0,01 g/l), acido nalidixico (0,04 g/l) e cicloeximide (0,05 g/l). Le brodoculture sono state incubate a 30° C per 48 ± 2 ore e quindi piastrate su Oxford Agar (Biokar Diagnostics). Dopo 48 ore di incubazione a 37°C si sono trapiantate da un minimo di 5 ad un massimo di 20 colonie sospette per campione su piastre di Tryptone Soya Agar con estratto di lievito (TSYEA, Oxoid). Le piastre sono state mantenute in termostato a 37° C per 24 ore al fine di ottenere colonie isolate. Su queste ultime sono state eseguite la colorazione di Gram, la prova della catalasi, la prova di mobilità ed il CAMP-test come previsto dalla norma ISO 10560. L'identificazione di specie è stata, infine, ottenuta mediante le prove biochimiche del sistema miniaturizzato API-Listeria (bioMérieux).

Per le salsicce si è impiegato il metodo d'analisi basato sul doppio arricchimento in brodo LEB (Listeria Enrichment Broth) secondo la formulazione UVM I ed UVM II. Un'aliquota di 25 grammi di campione è stata omogenata in 225 ml di brodo di primo arricchimento (LEB UVM I, Oxoid) e sottoposta ad un'incubazione a 30° C per 24 ore. Successivamente 0,1 ml della brodocultura sono stati trasferiti in 10 ml di brodo di secondo arricchimento (LEB UVM II, Oxoid), incubato a 30° C per 24 ore. La piastratura veniva quindi eseguita su Oxford Agar con incubazione a 37° C per 48 ore. Dalle colonie caratteristiche, seminate su TSYEA, venivano effettuati i test elencati in precedenza e la conferma biochimica era eseguita mediante il kit API-Listeria.

Il metodo VIDAS-LMO permette di eseguire un'analisi immuno-enzimatica a fluorescenza (ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay) con l'ausilio dello strumento VIDAS (bioMérieux). Il kit VIDAS-LMO è composto da un cono SPR (Specific Phase Receptacle) con adesivi agli anticorpi anti-*L. monocytogenes* e da una barretta costituita da una serie di pozzetti in cui sono contenuti la soluzione di lavaggio, gli anticorpi anti-*L. monocytogenes* coniugati alla fosfatasi alcalina ed il substrato fluorescente 4-metil-umbelliferil fosfato. La fluorescenza viene misurata a 450 nm dallo scanner ottico nello strumento VIDAS e viene espressa dal valore RFV (Relative Fluorescent Value - valore di fluorescenza relativa). Il risultato è stampato su carta direttamente dallo strumento e viene espresso come "positivo" o "negativo" sulla base del confronto tra il valore RFV del campione ed il valore di fluorescenza di uno standard.

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, 25 grammi dei campioni di mozzarella e di ricotta sono stati addizionati a 225 ml di Half-Fraser Broth (bioMérieux), mentre 25 grammi dei campioni di salsiccia sono stati omogenati con 225 ml di Fraser Broth (bioMérieux). Dopo incubazione a 30° C per 24-26 ore, si sono trasferiti 0,1 ml di brodo Half-Fraser (procedura specifica per i prodotti lattiero caseari) oppure 1 ml di brodo Fraser (procedura consigliata per altri prodotti alimentari) in 10 ml di Fraser Broth. Dal brodo di secondo arricchimento, trascorse 24-26 ore di incu-

bazione a 30° C, si è prelevata un'aliquota di 500 µl che è stata depositata nello specifico pozzetto SPR del kit VIDAS-LMO, ed utilizzata per l'analisi immuno-enzimatica dal sistema VIDAS. Il risultato, espresso come "positivo" o "negativo" in riferimento alla presenza/assenza di *L. monocytogenes* nel campione in esame, si rende disponibile nell'arco di soli 70 minuti.

E' in ogni caso consigliabile conservare a 2-8° C i brodi di secondo arricchimento, impiegati nella metodica VIDAS, in modo da poter confermare con l'isolamento su piastra ogni risultato positivo (Vaz-Vehlo *et al.*, 2000).

Risultati e conclusioni

Dai campioni di mozzarella non è mai stata isolata *L. monocytogenes*, mentre 2 (4,0%) campioni di ricotta vaccina sono risultati contaminati da *L. monocytogenes* ed 1 (2,0%) da *L. welshimeri*.

La metodica VIDAS-LMO ha identificato come "positivi" i campioni contaminati da *L. monocytogenes* in soli due giorni, mentre quello contaminato da *L. welshimeri* veniva considerato negativo.

Seguendo la metodica ISO 10560, le colonie sospette cresciute sulle piastre di terreno selettivo hanno dovuto sottostare alle diverse prove biochimiche di conferma. L'analisi ha quindi richiesto quattro giorni di tempo per giungere alla lettura delle piastre ed ulteriori tre giorni per le prove biochimiche e l'identificazione di specie.

Tenendo presente che ogni risultato positivo, fornito dalla procedura VIDAS, andrebbe confermato con l'isolamento su piastra (Vaz-Vehlo *et al.*, 2000), si è comunque di fronte ad un notevole risparmio di tempo (cinque giorni) quando la contaminazione, anziché da *L. monocytogenes*, è data da un'altra specie di *Listeria*. Questo risultato si è ottenuto grazie alla sensibilità (100%) e specificità (100%) che il metodo VIDAS-LMO ha dimostrato nei confronti del metodo ISO per l'isolamento di *L. monocytogenes* dai prodotti lattiero-caseari.

Le analisi eseguite sulle salsicce di carne suina hanno messo in evidenza un'incidenza molto elevata (57,8%) di campioni contaminati da *L. monocytogenes*. Il patogeno è stato, infatti, isolato da 26 campioni su 45; 25 di questi sono stati identificati con l'ausilio della metodica VIDAS-LMO, mentre il metodo analitico basato sul doppio arricchimento nei brodi LEB UVM I e UVM II ha individuato solo 14 campioni contaminati da *L. monocytogenes*.

La metodica VIDAS ha dunque presentato una sensibilità del 96,1%, mentre la procedura tradizionale ha mostrato una sensibilità decisamente più bassa (53,8%). La specificità del metodo VIDAS-LMO, valutabile in base ai dati della presente ricerca, è pari al 63,2%, dato che da sette campioni considerati "positivi" si è in realtà isolata *L. innocua*. Nonostante la validazione AFNOR (Nr BIO-12/3-03/96) non avesse rilevato reazioni crociate del metodo VIDAS-LMO con altre specie appartenenti al genere *Listeria*, nel nostro studio la specificità del sistema è stata intaccata dai sette risultati falsamente positivi.

Rimane comunque da sottolineare l'elevata sensibilità del metodo VIDAS-LMO che, unitamente alla conferma in piastra dei risultati "positivi", permette di ottenere risultati molto più soddisfacenti rispetto a quelli raggiungibili con le metodiche analitiche tradizionali.

L'Ordinanza Ministeriale 7 Dicembre 1993 stabilisce i limiti di tolleranza di *L. monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari, ad esclusione del latte e dei prodotti da esso derivati, e pertanto abbiamo testato con la metodica MPN, prevista dall'ordinanza stessa, i campioni di salsiccia che risultavano positivi all'analisi qualitativa. Allo scopo, un'aliquota del campione era stata appositamente mantenuta in congelatore e scongelata al momento del conteggio MPN. I risultati che abbiamo ottenuto mettono in evidenza la capacità del sistema VIDAS-LMO di rilevare la presenza di *L. monocytogenes* anche a livelli di contaminazione molto bassi: su 9 campioni di salsiccia che presentavano valori del patogeno inferiori a 3 *L. monocytogenes/g*, 8 (88,9%) sono stati considerati "positivi" dal sistema di immuno-rivelazione, mentre con il sistema analitico tradizionale ne sono stati individuati solo 4 (44,4%) (tabella n° 1). Il sistema analitico convenzionale acquista, invece, sensibilità con l'aumentare del livello di contaminazione del campione.

L'unico campione che il metodo VIDAS-LMO non ha evidenziato come "positivo" era contaminato da un ceppo di *L. monocytogenes* privo di attività emolitica. Il ritrovamento di ceppi non emolitici non è un'evenienza rara: infatti ben 3 campioni dei 26 contaminati dal microrganismo erano negativi al CAMP-test. Il sistema VIDAS-LMO ha rilevato due campioni contaminati da ceppi di *L. monocytogenes* privi di attività emolitica, in quanto, come ribadito da Allerberger *et al.* (1997), l'analisi immuno-enzimatica è specifica sia per i ceppi emolitici che non emolitici di *L. monocytogenes*. Il terzo ceppo non emolitico di *L. monocytogenes* è stato identificato con la metodica tradizionale, ma solo grazie al fatto che ogni colonia, anche se negativa al CAMP-test, è stata successivamente sottoposta alle prove biochimiche del sistema API-Listeria per l'identificazione di specie. Nelle analisi di routine i ceppi non emolitici, isolati con metodi microbiologici tradizionali, non vengono presi in considerazione come ceppi sospetti se la ricerca è mirata all'isolamento di *L. monocytogenes*, mentre sia la PCR che il Western-blotting sono in grado di identificarli con esattezza e riconoscere la loro appartenenza alla specie "*monocytogenes*".

In conclusione, possiamo ritenere che la metodica VIDAS-LMO per la ricerca di *L. monocytogenes* in prodotti alimentari di diversa natura, quali i prodotti lattiero-caseari ed i prodotti carnei oggetto della presente ricerca, si è dimostrata estrema-

Tabella n.1: Valutazione del sistema automatizzato VIDAS-LMO per la ricerca di *L. monocytogenes* in campioni di salsiccia suina.

Livello di contaminazione con metodica MPN (<i>L. monocytogenes/g</i>)	Campioni positivi con il sistema VIDAS-LMO	Campioni positivi con il metodo convenzionale	Campioni risultati complessivamente positivi
< 3	8 (88,9%)	4 (44,4%)	9
4-21	11 (100%)	7 (63,6%)	11
28-90	4 (100%)	3 (75,0%)	4
n.d.	2 (100%)	0 (0%)	2
	25 (96,1%)	14 (53,8%)	26

mente sensibile e specifica rispetto a metodi di isolamento tradizionali. In particolare, i risultati appaiono estremamente incoraggianti per l'analisi dei prodotti lattiero-caseari, tenendo presente che nella maggior parte di essi (97,5%) il risultato negativo era disponibile già dopo soli due giorni rispetto ai quattro richiesti dalla metodica ISO, se non addirittura ai sette giorni necessari per identificare una specie non patogena di *Listeria*.

Parole chiave: *L. monocytogenes*, VIDAS-LMO, salsiccia suina, mozzarella, ricotta

Key words: *L. monocytogenes*, VIDAS-LMO, pork sausage, Mozzarella cheese, Ricotta cheese

Mots clés: *L. monocytogenes*, VIDAS-LMO, saucisse de porc, Mozzarella, Ricotta

RIASSUNTO - Metodiche analitiche convenzionali per la ricerca di *L. monocytogenes* ed il metodo immuno-enzimatico VIDAS-LMO sono stati confrontati su diverse matrici alimentari per valutarne sensibilità, specificità e tempi di risposta. In totale sono stati analizzati 125 campioni, di cui 45 salsicce di carne suina, 30 mozzarelle e 50 ricotte vaccine tradizionali. Per i campioni di salsiccia è stato effettuato un arricchimento in *Listeria* Enrichment Broth UVM I e UVM II, seguito da piastratura su Oxford Agar, mentre i prodotti lattiero-caseari sono stati analizzati secondo la norma ISO 10560. Ogni prodotto è stato saggiato con la metodica VIDAS-LMO come prescritto dal produttore.

La sensibilità della metodica VIDAS-LMO si è rivelata del 96,1% per le salsicce suine e del 100%, pari alla norma ISO 10560, per i derivati del latte. Il metodo convenzionale impiegato per i prodotti carnei ha presentato una sensibilità del 53,8%. La specificità della procedura VIDAS-LMO è risultata del 100% per i prodotti lattiero-caseari e del 63,2% per le salsicce di carne suina. I tempi di risposta sono apparsi particolarmente rapidi con il metodo VIDAS in caso di risultato negativo: due giorni rispetto ai quattro richiesti dalle metodiche analitiche convenzionali.

SUMMARY – Conventional analytical methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products and the VIDAS-LMO method were evaluated for sensitivity, specificity and time saving. A total of 125 samples (45 pork sausages, 30 Mozzarella cheese and 50 Ricotta cheese samples) were analysed. Pork sausages were enriched in *Listeria* Enrichment Broth UVM I and UVM II, and Oxford Agar was employed as selective medium. Dairy-products were analysed accordingly to ISO 10560 method. All samples were tested with the VIDAS-LMO procedure following the manufacturer's instructions.

Sensitivity of the VIDAS-LMO method was 96.1% for pork sausages and 100% for dairy products. The ISO 10560 method for dairy products had 100% sensitivity, but the conventional method employed for pork sausages had a lower sensitivity (53.8%). Specificity of the VIDAS procedure was 100% for dairy products and 63.2% for pork sausages. The VIDAS-LMO method was time saving, requiring only two days instead of four in case of negative result.

RÉSUMÉ - On a comparé les méthodes d'analyse conventionnelles et le méthode immuno-enzymatique VIDAS-LMO, pour la recherche de *L.monocytogenes* dans des

matrices alimentaires pour en évaluer la sensibilité, spécificité et temps de réponse. On a analysé 125 échantillons, dont 45 saucisses de viande de porc, 30 fromages Mozzarella et 50 fromages « Ricotta » de vache. On ce qui concerne les échantillons de saucissons on a réalisée un enrichissement avec Listeria Enrichement Broth UVM I et UVM II, suivi par un distribution sur Oxford Agar, tandis que les produits laitiers ont été analysée parmi le méthode ISO 10560. Les produits ont testés avec le méthode VIDAS-LMO comme prescrit par le producteur .

On a relevé un niveau de sensibilité du méthode VIDAS-LMO égal a 96,1% pour le saucisses de porc et du 100%, comme le méthode ISO 10560, pour les produits qui laitiers Le méthode conventionnel utilisé pour le produits de chair a envisagé une sensibilité du 53,8%. La spécificité du méthode VIDAS-LMO été du 100% pour les produits laitieres et du 63,2% pour les saucisses de viande de porc. Les temps d'attente pour la réponse du résultat ont été particulièrement rapides avec le méthode VIDAS- LMO, pour le résultat négatif: deux jours par rapport aux quatre nécessaire avec le méthode conventionnel.

Bibliografia

- Allerberger F., Dierich M., Petranyi G., Lalic M., Bubert A. (1997). Nonhemolytic strains of *Listeria monocytogenes* detected in milk products using VIDAS immunoassay kit. Zbl. Hyg., 200, 189-195.
- Aureli P., Fiorucci G.C., Caroli D., Marchiaro G., Novara O., Leone L., Salmaso S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. New England J. Med., 27, 1236-1241.
- Farber J.M. (2000). Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat-seafood products. Int. J. Food Microbiol., 62, 247-251.
- Loncarevic S., Danielsson-Tham M.L., Tham W. (1995). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. Int. J. Food Microbiol., 26, 245-250.
- Lyytikäinen O., Autio T., Majjala R., Ruutu P., Honkanen-Buzalski T., Miettinen M., Hatakka M., Mikkola J., Anttila V.J., Johansson T., Rantala L., Aalto T., Korkeala H., Siitonen A. (2000). An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. J. Infect. Dis., 181, 1838-1841.
- Messi P., Casolari C., Fabio A., Fabio G., Gibertoni C., Menzioni G., Quaglio P. (2000). Presenza di *Listeria* in matrici alimentari. Industrie Alimentari, 39, 151-157.
- Pezzotti G., Bolognani G., Farina G., Mioni R. (2000). Contaminazione da *Listeria monocytogenes* in prodotti alimentari. Atti X Congresso A.I.V.I., Marsala, 11-14 Ottobre, 109-113.
- Pinto B., Reali D. (1996). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other listerias in Italian-made soft cheeses. Zentralbl. Hyg. Umweltmed., 199, 60-68.
- Rorvik L.M., Aase B., Alvestad T., Caugant D.A. (2000). Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4779-4784.

- Tham W., Ericsson H., Loncarevic S., Unnerstadt H., Danielsson-Tham M.L. (2000). Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold-smoked fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 173-175.
- Vaz-Velho M., Duarte G., Gibbs P. (2000). Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. *J. Microbiol. Methods*, 40, 147-151.

Si ringrazia il Dott. Ennio Del Puppo per la cortese collaborazione.

Ricerca finanziata in parte con contributo ex-M.U.R.S.T 40% - 1999