

CONFRONTO TRA DUE METODICHE PER LA RICERCA E L'ISOLAMENTO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*

COMPARISON OF TWO METHODS FOR THE DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Novello L., Di Pinto A., Bonerba E., Montemurro F., Tantillo G.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia – Sezione Controllo e Sicurezza degli Alimenti- Facoltà di Medicina Veterinaria –
Università degli Studi di Bari

SUMMARY

The aim of this study was to compare the performance of the conventional methods for detection of *Listeria monocytogenes* in food using media Oxford and ALOA (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti) in according to the ISO 11290-1 to a new chromogenic medium “CHROMagar *Listeria*” standardized in 2005 AFNOR (CHR – 21/1-12/01). A total of 40 pre-packed ready-to-eat food samples were examined. Using two methods six samples were found positive for *Listeria monocytogenes* but the medium “CHROMagar *Listeria*” was more selective in comparison with the others. In conclusion this study has demonstrated that isolation medium able to target specifically the detection of *L. monocytogenes* such as “CHROMagar *Listeria*” is highly recommendable because of that detection time is significantly reduced and the analysis cost is less expensive.

Key words

Listeria monocytogenes, CHROMagar *Listeria*, ready to eat.

INTRODUZIONE

Listeria monocytogenes è un microrganismo di interesse igienico-sanitario, ubiquitario, spesso associato a numerosi episodi epidemici di listeriosi collegati alle mutate abitudini alimentari, al maggior consumo di alimenti *ready to eat* e alla ricerca di cibi etnici.

Listeria monocytogenes è in grado di moltiplicare anche a temperature di refrigerazione e mostra particolare resistenza agli agenti fisico-chimici e nell'ambiente può sopravvivere per lungo tempo (1). Gli alimenti che sono più sovente associati con la listeriosi umana sono i *ready to eat*, poiché questi rappresentano un ottimo substrato per lo sviluppo di *L. monocytogenes*, sia perché la conservazione a temperature di refrigerazione ne consente una lunga vita commerciale, sia perché non subiscono il processo di cottura, fattore che ne aumenta il rischio (2).

Tuttavia anche la globalizzazione dei mercati (3), le nuove “mild technologies”, studiate per mantenere quanto più inalterate le caratteristiche organolettiche, come pure l'inadeguata sanificazione delle superfici di lavoro, sono i numerosi fattori che favoriscono la presenza di listeria negli alimenti.

L'aumento dell'incidenza di listeriosi nell'uomo che si riscontra annualmente e il tasso di mortalità che ormai supera il 20% nella popolazione colpita (4), ha indotto l'Autorità Europea con il Reg. 2073/2005 e successive modifiche a stabilire i limiti microbiologici per *L. monocytogenes* nei diversi alimenti al fine di garantire la salute del consumatore.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di confrontare la sensibilità e la specificità dei metodi di ricerca indicati dal Reg. 2073/2005 per la ricerca di *Listeria monocytogenes* (metodo ISO 11290-1) che raccomanda l'utilizzo del terreno ALOA (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti) e del terreno

Oxford, con il nuovo terreno “CHROMagar Listeria” che ha ottenuto la validazione AFNOR (CHR – 21/1-12/01) nel 2005.

MATERIALI E METODI

Per la nostra indagine sono stati analizzati 40 tipi di alimenti *ready to eat* acquistati nella GDO, discount e distributori automatici così suddivisi: 10 campioni di salmone affumicato confezionato sottovuoto, 5 tramezzini confezionati al tonno e verdure, 5 tramezzini confezionati con gamberetti e maionese, 5 insalate capricciose con maionese, 5 confezioni di crema ai quattro formaggi e 10 confezioni di salumi affettati in ATM.

I 40 campioni sono stati conservati in laboratorio alla temperatura di + 6 °C sino al momento dell’analisi eseguita sempre in prossimità della data di scadenza indicata sulla confezione.

La ricerca di *L. monocytogenes* in tutti i campioni è stata eseguita secondo la procedura ISO 11290-1 che utilizza il terreno ALOA (Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti, Biolife) e seguendo contemporaneamente anche il protocollo AFNOR che prevede l’uso del terreno CHROMagar Listeria (CHROMagar Microbiology, Paris, France) (5).

Per l’esecuzione di entrambi i metodi, per il primo arricchimento, sono stati prelevati 25 g di ciascun campione ai quali sono stati addizionati 225 ml di half Fraser broth (OXOID), il tutto è stato omogeneizzato in stomacher; il campione quindi è stato posto ad incubare a 30 °C per 24h. Per ottemperare

al secondo arricchimento, 0,1 ml di brodocoltura primaria sono stati inoculati in 10 ml di Fraser broth (OXOID) e incubata a 37°C per 48h; contemporaneamente sono state eseguite semine della brodocoltura primaria su terreno di Oxford (OXOID), terreno ALOA (Biolife) e terreno CHROMagar listeria base (CHROMagar Microbiology, Paris, France); tutte le piastre sono state incubate a 37°C per 24 – 48h.

Successivamente anche dal secondo arricchimento si è proceduto al prelievo di 0,1ml della brodocoltura che è stata seminata su terreno di Oxford, di ALOA e di CHROMagar listeria base; tutte le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 – 48 h.

Le colonie ritenute sospette per *L. monocytogenes* evidenziate sul terreno di Oxford (colonie grigio scuro circondate da alone nero) e sul terreno di ALOA (colonie verdi - blu circondate da alone opaco) sono state isolate e sottoposte a test di verifica tramite colorazione di Gram, catalasi, ossidasi ed emolisi su agar sangue e ad identificazione biochimica mediante sistema API Listeria (bioMérieux).

Le colonie ritenute sospette per *L. monocytogenes* evidenziate sul terreno CHROMagar listeria base (colonie blu circondate da alone bianco), ottenute sia dal primo che dal secondo arricchimento, sono state direttamente confermate utilizzando piastre di terreno CHROMagar identification listeria (CHROMagar Microbiology, Paris, France) così come previsto dalla metodica.

Ogni piastra di CHROMagar identification listeria è stata suddivisa in tre quadranti, in ognuno dei quali è stata seminata un’ansata della colonia sospetta; le piastre sono state incubate alla tempe-

Tab. 1 Presenza di *Listeria* spp nei campioni in esame (valori riportati in %)

Campioni alimenti (numero campioni)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanoii</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Staphylococcus</i> spp
Salmone affum. ATM (10)	3 (30%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)
Tramezzini tonno + verdure (5)	1 (20%)	—	—	4 (80%)
Tramezzini gamberetti + maionese (5)	2 (40%)	—	—	2 (40%)
Insalata capricciosa + maionese (5)	—	—	—	2 (40%)
Crema ai 4 formaggi (5)	—	—	—	—
Salumi affettati in ATM (10)	—	—	—	2 (20%)
Totale (40)	6 (15%)	2 (5%)	2 (5%)	12 (30%)

ratura di 37 °C per 24h.

La conferma della presenza di *L. monocytogenes* sul terreno CHROMagar identification listeria è data dalla crescita di colonie color malva circondate da aloni bianchi.

Il CHROMagar identification listeria, infatti, è un terreno colturale che permette l'identificazione e la distinzione di *L. monocytogenes* dalle altre specie del genere *Listeria*.

RISULTATI

La nostra indagine ha messo in evidenza la presenza di *Listeria* spp nel 25% dei campioni analizzati, mentre *Listeria monocytogenes* è stata rilevata solo nel 15% di essi (6/40) (Tab. 1). *Listeria ivanovi* è invece stata isolata su due campioni (5%), così come per *L. grayi* (5%).

In particolare *Listeria monocytogenes* è stata riscontrata in 3 campioni di salmone affumicato (3/10, 30%), in un campione di tramezzino con verdure e tonno (1/5, 20%), in due campioni di tramezzini con gamberetti e maionese (2/5, 40%).

Di particolare rilevanza sono i dati relativi alla presenza di *L. ivanovii*, in quanto in letteratura, sono riportati casi di listeriosi umana sostenuti da questa specie anche se la sua presenza negli alimenti è abbastanza rara (5,6,7,8).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'analisi della Tab. 2, mostra come il CHROMagar *Listeria* base sia un terreno cromogeno più se-

lettivo del terreno Oxford e del terreno ALOA. in quanto solo in due campioni ha consentito la crescita di altri microrganismi (*Staphylococcus* spp). Il terreno ALOA ha evidenziato, infatti, colonie morfologicamente simili, per forma e colore, alle colonie di *Listeria* spp, ma l'identificazione biochimica non ha confermato l'appartenenza delle colonie al genere *Listeria* e il terreno Oxford ha consentito la crescita di numerose colonie chiare che, sottoposte ad identificazione biochimica, sono risultate appartenenti al genere *Staphylococcus*.

Inoltre l'Oxford risulta essere un terreno selettivo ma non differenziale, poiché è basato sull'idrolisi dell'esculina, reazione comune a tutte le specie di *Listeria*, e pertanto non riesce a differenziare *L. monocytogenes*.

Il terreno CHROMagar *Listeria* base e il terreno ALOA sono invece terreni più selettivi, sia per la presenza di miscela antimicrobica che di sostanze cromogeniche e differenziali; nella composizione di entrambi i terreni è prevista la presenza del composto cromogenico X-glucoside, che mette in evidenza l'enzima -glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria*; inoltre essi consentono l'evidenziazione di colonie di *Listeria monocytogenes* poiché inducono l'azione della fosfolipasi C, specifica della sola specie di *L. monocytogenes* e di alcuni ceppi di *L. ivanovii*, in grado di idrolizzare il fosfatidilinositolo aggiunto al mezzo di coltura (5). L'azione biochimica e/o cromogenica, specifica e selettiva del terreno CHROMagar *Listeria* base e del terreno CHROMagar identification *Listeria* sono invece coperte da segreto industriale (Tab. 2).

Sul terreno ALOA è stato possibile evidenziare la presenza di *L. monocytogenes*, in diversi campioni,

Tab. 2 Composizione e selettività della mix antimicrobica dei terreni utilizzati

Terreno selettivo	Mix antimicrobica	Numero campioni	<i>L. monocy</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>St. spp</i>
OXFORD	Cloruro di Litio Cicloeximide Acriflavina Colistina solfato Cefotetan fosfomicina	40	6	2	1	10
ALOA	Ceftazidime PolimixinaB Ac. Nalidissico cicloeximide	40	6	2	2	8
CHROMAGAR	Ignota	40	6	2	2	2

dopo 48 h d'incubazione, crescita ottenuta sia dall'arricchimento primario che da quello secondario. Le piastre di CHROMagar listeria base hanno consentito lo sviluppo delle tipiche colonie di *L. monocytogenes*, blu circondate da aloni bianchi, dopo solo 24h ore d'incubazione e già dall'arricchimento primario.

La nostra indagine, ha dimostrato che tutti i terreni utilizzati mostrano una eguale capacità di evidenziare la presenza di *L. monocytogenes*, se pur con tempi di analisi molto diversi (Tab. 3).

Per quanto riguarda l'identificazione delle colonie di *L. monocytogenes* cresciute sul terreno CHROMagar listeria base, ed effettuata su piastre di CHROMagar identification listeria, i risultati sono assolutamente sovrapponibili a quelli ottenuti mediante sistema API Listeria (bioMérieux), inoltre la conferma avviene in tempi molto più rapidi.

Questa indagine ha dimostrato che l'applicazione del metodo validato AFNOR (CHR – 21/1-12/01- 2005) che utilizza il terreno CHROMagar listeria base e il terreno CHROMagar identification listeria, permette di dare risultati negativi per presenza di *L. monocytogenes* solo dopo 2 giorni, e di positività dopo 3 giorni dall'inizio delle analisi; con il metodo ISO 11290-1 invece i risultati negativi possono essere disponibili solo dopo 5-11 giorni e di conseguenza il risultato positivo solo dopo 8-11 giorni. A nostro avviso, l'introduzione del metodo che utilizza il terreno CHROMagar listeria base e CHROMagar identification listeria tra quelli utilizzati per l'isolamento di *L. monocytogenes*, riduce i tempi ed i costi d'analisi e consente di intervenire con maggiore tempestività nel caso di non conformità e quindi di rendere più semplice l'applicazione delle misure previste nell'art.7 del Reg. 2073/2005 in caso di presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti *ready to eat*.

I risultati analitici ottenuti sugli alimenti *ready to eat* dimostrano come la problematica della presenza di *L. monocytogenes* sia ancora attuale e generalizzata, nonostante i controlli imposti alle Aziende.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ryser E. T. and Marth E. H. (1991). Listeria. Listeriosis and Food Safety. *New York: Marcel Dekker*.
- 2) Rocourt J. (1996). Risk factors for Listeriosis. *Food Control* 7, 195-202
- 3) Colavita G. (2008). Igiene e tecnologie degli alimenti di origine Animale. *Le Point Vétérinaire Italie Srl*, (12.5), 377-381
- 4) Becker B., Schuler S., Lohneis M., Sabrowski A., Curtis G.D.W., Holzappel W. H. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of Listeria monocytogenes with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 127-131
- 5) Marrakchi A.El, N. Boum'handi and Hamana A. (2005). Performance of new chromogenic plating medium for the isolation of Listeria monocytogenes from marine environments. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 87-91
- 6) Tiecco G. (2000). Microbiologia degli alimenti di Origine Animale. *Calderini Edagricole*.
- 7) Hithchins A.D. (2002). Critical Steps in detection of L. monocytogenes using the FDA BAM culture methodology. *Lecture on the 5th Annual Food Pathogen Analysis Conference. St. Pete Beach, Florida, 29th July*
- 8) Reissbrodt R. (2004). New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic Listeria spp-an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 1-9
- 9) Reg. (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005

Tab. 3 Campioni positivi per L. m. e L. spp secondo i risultati ottenuti con i diversi terreni selettivi utilizzati nell'indagine in ragione dei tempi di incubazione

	ARRICCHIMENTO PRIMARIO						ARRICCHIMENTO SECONDARIO					
	OXFORD		ALOA		CHROM		OXFORD		ALOA		CHROM	
	24h	+ 24h	24h	+ 24h	24h	+ 24h	24h	+ 24h	24h	+ 24h	24h	+ 24h
<i>Listeria monocytogenes</i>	—	+ (2)	+ (2)	+ (4)	+ (6)	+ (6)	+ (1)	+ (6)	+ (4)	+ (6)	+ (6)	+ (6)
<i>Listeria spp</i>	—	—	+ (1)	+ (4)	+ (4)	+ (4)	+ (2)	+ (3)	+ (4)	+ (4)	+ (4)	+ (4)
Non <i>Listeria spp</i> con colonie morfologicamente uguali	—	—	+ (2)	+ (6)	+ (2)	+ (2)	—	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)