

Applicazione del sistema automatizzato (Vidas®) per la ricerca di *Salmonella* spp: comparazione con il metodo microbiologico tradizionale

¹ L. Fiorentini, ¹ P. Massi, ¹ G. Tosi, ² S. Tabanelli.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sez. Diagnostica di Forlì

²BioMérieux-Italia S.p.A., Roma

Riassunto. In un periodo complessivo di quattro mesi, presso il laboratorio di diagnostica batteriologica della sezione di Forlì dell'I.Z.S.L.E.R., è stato fatto uno studio comparativo per l'individuazione della *Salmonella* su campioni patologici di organi prelevati in sede autoptica, feci, residui d'incubazione del pollame, uova embrionate di diverse specie aviarie, utilizzando due metodi diagnostici: microbiologico tradizionale ed un sistema automatizzato (VIDAS® *Salmonella*, BioMérieux-Vitek, U.S.A.), finora impiegato nell'ambito della microbiologia degli alimenti. Le salmonelle, oltre a rappresentare uno dei principali agenti responsabili di intossicazioni alimentari, hanno notevole valenza anche nel settore della patologia aviaria. Per questo motivo la loro ricerca, tramite protocolli tradizionali, può prolungarsi fino a cinque giorni. Sicuramente metodi automatizzati contribuiranno ad accelerare e semplificare la diagnosi. I risultati di questa ricerca mostrano l'efficacia del sistema VIDAS®, del tutto sovrapponibile al metodo microbiologico tradizionale, tenendo conto dei non trascurabili vantaggi apportati da un sistema automatizzato ed innovativo.

Abstract. A comparative studies between VIDAS® and microbiological test to detection of *Salmonella*, was carried out on 353 samples during four months at diagnostic laboratory of I.Z.S.L.E.R. in Forlì. VIDAS® *Salmonella* is a fully automated method for the immuno-concentration of *Salmonella* from foods. It replaces traditional selective enrichment procedures with an automated immunological capture and specific release process. The released organisms may then be transferred to a non selective broth for growth prior to detection by immunoassay, or directly plated on a specific *Salmonella* agar. Results of this trial showed an efficacy of this test very similar to traditional method.

Introduzione

In un periodo complessivo di circa quattro mesi, compreso tra aprile e luglio 2002, sono stati sottoposti ad esame per ricerca *Salmonella* 2291 campioni conferiti alla Sezione Diagnostica di Forlì dell'I.Z.S.L.E.R. Di questi, 353 sono stati analizzati in doppio con metodo microbiologico "tradizionale" e con sistema automatizzato VIDAS® *Salmonella*, BioMérieux-Vitek, U.S.A. Si tratta di un test quali-

tativo impiegato normalmente per i prodotti alimentari e per i campioni ambientali, entrato quindi nell'uso comune di molti laboratori annessi alle industrie alimentari. Contemporaneamente alla routine diagnostica, sono state fatte prove sperimentali di comparazione tra metodo VIDAS® *Salmonella* e microbiologico tradizionale a partire da 90 campioni sperimentalmente contaminati con 400 UFC /ml di *Salmonella typhimurium* (concentrazione minima di cellule batteriche rilevabile dal VIDAS®).

Materiali e metodi

Sistema VIDAS® *Salmonella*

E' un sistema automatizzato selettivo per l'esecuzione di determinazioni immunoenzimatiche, che permette l'individuazione di antigeni di *Salmonella* attraverso il metodo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*). Le salmonelle formano un gruppo antigenico complesso, con più di 2400 serovar differenziati da antigeni somatici (O) di natura liposaccaridica e da antigeni flagellari (H) di natura proteica. Il test VIDAS® utilizza anticorpi monoclonali di cattura ad alta specificità, tutti diretti contro antigeni O ed H. Questo sistema prevede l'uso di coni monouso all'interno dei quali sono contenuti anticorpi anti-*Salmonella* adsorbiti alla superficie. Gli altri reagenti sono pre-diluiti in cartucce fornite dal kit. Tutte le fasi del test vengono realizzate automaticamente. Dopo aver provveduto a trasferire all'interno della cartuccia un'aliquota riscaldata del brodo di arricchimento, il campione viene introdotto all'interno del cono, al fine di attivare la reazione. Gli antigeni presenti nella brodocoltura si legano agli anticorpi monoclonali anti-*Salmonella*. I componenti non fissati vengono eliminati tramite fasi di lavaggio. In seguito, vengono addizionati anticorpi coniugati, marcati con fosfatasi alcalina, i quali si fissano ad antigeni di *Salmonella*, fissatisi nelle fasi precedenti agli anticorpi della parete del cono. Altre fasi di lavaggio eliminano il coniugato libero. Nella fase finale di rivelazione viene aggiunto un substrato (4-Metil-umbelliferilfosfato), mentre l'enzima del coniugato ne catalizza l'idrolisi in un prodotto fluorescente (reazione colorimetrica).

Una volta terminato il test, al massimo dopo 24 ore, i valori letti vengono analizzati automaticamente da un sistema informatico che esprime il risultato come positivo o negativo.

Metodo microbiologico tradizionale

E' un metodo qualitativo che richiede cinque successivi stadi:

- pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo (acqua peptonata tamponata) inoculato con il campione in esame e, dopo omogeneizzazione, incubato a +37°C per 24 ore;
- arricchimento in terreni liquidi selettivi (Brodo selenito cistina o/e Brodo Rappaport-Vassiliadis), con incubazione per 24 ore a +37°C o +42°C a seconda del terreno utilizzato;

- piastratura su terreno solido selettivo e differenziale (Hektoen Enteric Agar), con successiva incubazione per 24 ore a +37°C;
- trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar, da incubare per 24 ore a +37°C;
- Identificazione biochimica e sierologica delle colture selezionate.

Il tempo complessivo necessario per la diagnosi è di almeno 72 ore.

Risultati

I risultati sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

Discussione

La ricerca della salmonelle richiede normalmente, per una corretta diagnosi, almeno tre giorni ed è pertanto lecito considerare questi tempi relativamente troppo lunghi. Sicuramente lo sviluppo e la messa a punto di metodi diagnostici innovativi sono indirizzati verso il riconoscimento del patogeno in tempi ridotti, per offrire la possibilità di intervenire tempestivamente.

Il VIDAS® presenta il vantaggio di abbreviare da 24 a 48 ore i tempi necessari per giungere alla diagnosi. Inoltre permette di ridurre al minimo gli errori legati alla manualità dell'operatore e, in particolare, alle possibili contaminazioni crociate durante l'esecuzione delle analisi. Per garantire queste prerogative, ogni prova viene registrata singolarmente con un codice a barre o report completo; i kit sono pronti all'uso e minimizzano gli interventi manuali; l'automazione consente un'interpretazione obiettiva dei risultati, indipendentemente dal fattore umano. L'uso del sistema permette anche di ripartire meglio il carico di lavoro settimanale del laboratorio.

Gli inconvenienti del VIDAS® sono soprattutto legati al non trascurabile costo degli esami e alla necessità di conservare e preparare correttamente i campioni, pena la cattiva riuscita delle prove. Alcune reazioni crociate possono essere osservate con ceppi di *Citrobacter* e *Hafnia*, anche se in percentuale trascurabile.

Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti, il sistema VIDAS® può essere considerato affidabile anche su matrici diverse da quelle testate con tale metodo fino ad

Tabella 1 - Esami di diagnostica batteriologica eseguiti in parallelo con metodo tradizionale e VIDAS®

Numero di campioni		353	
Metodo	VIDAS® <i>Salmonella</i>	Tradizionale	
Positivi	4 (1,1%)	3 (0,8%)	
Negativi	349 (98,9%)	350 (99,2%)	
Falsi Positivi*	2 (0,5%)	0	

*Falsi positivi: due ceppi di *Citrobacter freundii*

Tabella 2 - Esami sperimentali eseguiti in parallelo a partire da campioni artificialmente contaminati con 400 UFC/ml di *Salmonella typhimurium*

Numero di campioni		90	
Metodo	VIDAS® <i>Salmonella</i>	Tradizionale	
Positivi	79 (87,7%)	69 (76,6%)	
Negativi	11 (12,3%)	21 (23,4%)	
Falsi Positivi	0	0	

oggi, essenzialmente di natura alimentare. Difatti può essere applicato anche all'analisi di campioni di feci e di liquidi organici, visceri prelevati in sede autoptica, uova embrionate, residui di incubazione. Per queste possibilità esso può trovare applicazione pratica nella diagnostica clinica sia umana che veterinaria, oltre che nel controllo ufficiale e nell'autocontrollo aziendale finalizzati alla ricerca delle salmonelle.

Ringraziamenti

Si ringrazia il personale tecnico del Laboratorio di Diagnostica Batteriologica dell' I.Z.S.L.E.R., sezione di Forlì.

Bibliografia

1. Division of Microbiology - Center for Food Safety and Applied Nutrition - U.S. F.D.A. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA, 1984, 7.01-7.18
2. ICMSF Microorganisms in food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd Edition, University of Toronto Press, Toronto, 160-172, 1988.
3. F.D.A., Bacteriological Analytical Manual, 7th ed., AOAC International, Arlington, Virginia, USA, 2201-3301, 1992.
4. Norme ISO 6579, Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*, AFNOR, Décembre 1993.
5. Kerrs HJ, Ball HJ, Mackie DP, Pollock DA and Finlay DA. Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella*, J. Appl. Bact. 72, 302-308, 1992.