

# Sviluppo e validazione di un antigene-capture ELISA basato su anticorpi monoclonali specifici per *Listeria monocytogenes* negli alimenti

Ottavio Portanti, Tiziana Di Febo, Mirella Luciani, Cinzia Pompili, Rossella Lelli & Primula Semprini<sup>†</sup>

## Riassunto

È stato standardizzato e validato un dosaggio immunoenzimatico capture ELISA per l'identificazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti. Il dosaggio è stato messo a punto analizzando campioni di prodotti carnei, ittici e lattiero-caseari, pasta di semola e di farina di grano. Il metodo è risultato specifico al 100% per *Listeria* spp., con limite di rivelazione di  $6,6 \times 10^3$  cfu/ml. Il metodo *L. monocytogenes* capture ELISA è stato confrontato con il metodo ufficiale ISO 11290-1:1996 per l'isolamento e l'identificazione di *L. monocytogenes* in matrici alimentari ottenendo un indice di concordanza significativo. Il dosaggio è stato validato in base alle indicazioni della norma ISO 16140:2003 relativamente ai metodi di analisi qualitativi. Il dosaggio è risultato accurato, specifico, sensibile, selettivo, riproducibile e rapido da eseguire, consentendo nello screening degli alimenti la riduzione di tempi e costi dell'indagine microbiologica.

## Parole chiave

Alimenti, Capture ELISA, ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay, Igiene, Italia, *Listeria monocytogenes*.

## Introduzione

Il genere *Listeria* comprende 6 specie, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*, in grado di crescere in ampi intervalli di temperatura (da

1 a 45°C), pH (da 5 a 9) e osmolarità (1-10% cloruro di sodio). Il microorganismo è un ideale agente di contaminazione di cibi freschi e conservati (2, 8, 9, 10), viene rinvenuto in prodotti carnei, ittici e lattiero-caseari (latte non pastorizzato e formaggi a pasta molle), vegetali, salse e gelati (2, 3, 5, 7, 22, 24, 25) e in ambienti adibiti alla lavorazione degli alimenti (13, 16).

*L. monocytogenes* è un agente patogeno che può causare nell'uomo diverse sindromi cliniche (listeriosi) con diarrea, aborto e meningite a volte con esito fatale soprattutto in soggetti con compromissione del sistema immunitario (cancro, HIV ecc.), anziani e donne in stato di gravidanza.

Il tasso di incidenza annuale dei casi di listeriosi in Europa e negli Stati Uniti d'America varia da 2 a 15 casi per milione di individui, con un tasso di mortalità che può superare il 50% dei casi (2). Nell'anno 2008 solo negli USA sono stati riportati 2500 casi di infezione da *Listeria* spp. con 500 decessi e con oltre il 60% degli alimenti posti sotto sequestro contaminato da *L. monocytogenes*. Il Regolamento CE 2073/2005, che sancisce i criteri microbiologici da applicare nei programmi di controllo della sicurezza alimentare, stabilisce la totale assenza di *L. monocytogenes* oppure il limite massimo di 100 cfu/g come requisito di sicurezza per vari tipi di alimento pronti per il consumo.

<sup>†</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Campo Boario, 64100 Teramo, Italia  
o.portanti@izs.it

Il tasso di incidenza annua dei casi di listeriosi in Europa e negli Stati Uniti d'America varia da 2 a 15 casi per milione di persone, con un tasso di mortalità che può superare il 50% dei casi (2). Nell'anno 2008 solo negli USA sono stati riportati 2500 casi di infezione da *Listeria* con 500 decessi e oltre il 60% degli alimenti posti sotto sequestro è risultato contaminato da *L. monocytogenes*. Il Regolamento CE 2073/2005, che sancisce i criteri microbiologici da applicare nei programmi di controllo di sicurezza alimentare, stabilisce la totale assenza di *L. monocytogenes* oppure il limite massimo di 100 cfu/g come requisito di sicurezza per vari tipi di alimenti pronti per il consumo entro la data limite di conservazione.

I metodi più utilizzati per la ricerca di *L. monocytogenes* sono quelli microbiologici convenzionali basati sull'identificazione biochimica, quelli che si avvalgono della tecnica PCR e quelli che prevedono il dosaggio immunologico (ELISA, Western Blotting) (3, 5, 7, 8, 13, 15, 19, 21, 22, 23, 25). I metodi convenzionali richiedono tempi di esecuzione relativamente lunghi, quelli basati sulla tecnica PCR risultano più rapidi anche se richiedono apparecchiature costose (26), i saggi immunologici (27) risultano più adeguati per uno screening rapido e a basso costo degli alimenti.

Il presente articolo descrive la standardizzazione e la validazione di un metodo capture ELISA per la rivelazione di *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari. Il metodo opportunamente allestito in formato kit pronto all'uso potrebbe essere adottato dai laboratori di igiene degli alimenti.

## Materiali e metodi

### Anticorpi monoclonali

Anticorpi monoclonali (MAbs) anti-*L. monocytogenes* sono stati prodotti immunizzando topi Balb/c con un ceppo di *L. monocytogenes* (ATCC 7644) inattivato al calore e sonicato. Il lisato cellulare, alla concentrazione proteica di 50 µg/ml, è stato emulsionato con adiuvante di Freund completo e, in seguito, inoculato per via intraperitoneale. Successivamente sono state effettuate altre 3 inoculazioni di lisato cellulare con adiuvante di Freund

incompleto emulsionato con PBS. Gli splenociti sono stati sottoposti a fusione con cellule di mieloma di topo Sp2/O-Ag-14. Gli ibridomi sono stati coltivati in terreno *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* contenente 20% di siero fetale bovino, HAT 50×, antibiotici e antimicotici. Gli ibridomi secernenti anticorpi anti-*L. monocytogenes* sono stati clonati secondo la metodica delle diluizioni limite (4, 11, 28). Lo screening degli ibridomi è stato effettuato mediante ELISA indiretto impiegando micropiastre attivate con lo stesso antigene utilizzato per l'immunizzazione degli animali da esperimento (17). Sono state, inoltre, verificate con il medesimo metodo le reazioni crociate con diversi ceppi batterici (18). È stato determinato l'isotipo, i MAbs con isotipo IgG sono stati purificati mediante cromatografia di affinità con proteina A e coniugati con perossidasi (1, 20).

### Ceppi batterici

I ceppi batterici utilizzati nella standardizzazione e validazione di *L. monocytogenes* capture ELISA sono stati ottenuti da *American Type Culture Collection* (ATCC), *Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucher-schutz und Veterinärmedizin* (BGVV) e dalla collezione di laboratorio di ceppi batterici isolati da campioni di alimenti (Tabella I). I ceppi isolati dai campioni di alimenti sono stati identificati e caratterizzati utilizzando metodi biochimici e sierologici. I microrganismi utilizzati sono stati coltivati in *Brain Heart Infusion Broth* a 37°C per 14-16 h. Le sospensioni batteriche sono state titolate, preparate alla concentrazione di utilizzo di  $2 \times 10^8$  cfu/ml e sottoposte a lisi cellulare mediante trattamento termico.

### Campioni di alimenti

I campioni di alimenti, prodotti carnei, ittici e lattiero-caseari, pasta di semola e farina di grano, impiegati nella sperimentazione, sono stati reperiti sul mercato e nel laboratorio dell'Istituto G. Caporale impiegando i prodotti sottoposti all'attività diagnostica di routine. Sono state prelevate aliquote di 25 g per la preparazione di matrici non infette e matrici artificialmente infette con *L. monocytogenes* e con ceppi batterici non target. Le matrici alimentari sono state infettate con  $10 \pm 3$  cfu/ml

Tabella I  
Ceppi batterici utilizzati nei processi di standardizzazione e validazione

Batterio	Origine	Batterio	Origine
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)*	ATCC	<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC 19119)*	ATCC
<i>Bacillus cereus</i> *	Collezione	<i>Listeria ivanovii</i> *	Collezione
<i>Bacillus subtilis</i> *	Collezione	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)*	ATCC	<i>Listeria monocytogenes</i>	Collezione
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Collezione	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 49132)	ATCC
<i>Citrobacter freundii</i>	Collezione	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Collezione
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Collezione	<i>Salmonella bredeney</i>	Collezione
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Collezione	<i>Salmonella derby</i>	Collezione
<i>Enterobacter cloacae</i>	Collezione	<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 25923)*	ATCC	<i>Salmonella enteritidis</i>	Collezione
<i>Enterococcus faecium</i> *	Collezione	<i>Salmonella hadar</i>	Collezione
<i>Enterococcus faecium</i> *	Collezione	<i>Salmonella muenchen</i>	Collezione
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)*	ATCC	<i>Salmonella panama</i>	Collezione
<i>Escherichia coli</i> *	Collezione	<i>Salmonella saint-paul</i>	Collezione
<i>Escherichia coli</i> O14 (BGVV)	BGVV	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	ATCC
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Collezione	<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	ATCC
<i>Escherichia fergusonii</i>	Collezione	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)*	ATCC
<i>Hafnia alvei</i> *	Collezione	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Collezione
<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC 49131)	ATCC	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	ATCC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Collezione	<i>Staphylococcus lentis</i> *	Collezione
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)*	ATCC	<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 23715)	ATCC
<i>Listeria innocua</i> *	Collezione	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Collezione

\* Ceppi non target utilizzati per la determinazione della selettività

ATCC American Type Culture Collection

Collezione collezione di ceppi batterici del laboratorio

BGVV Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin

di ogni specifico microrganismo, omogenate in stomacher e processate fino alla preparazione della brodocoltura con Brodo Fraser, secondo il metodo ISO 11290-1:1996 (12). Le brodoculture sono state sottoposte a trattamento termico e analizzate mediante *L. monocytogenes* capture ELISA.

### **Listeria monocytogenes capture ELISA**

Micropiastre a 96 pozzetti sono state attivate con il MAb 9B8F7 (anti-*L. monocytogenes*) dispensando 100 µl/pozzetto alla concentrazione di 20 µg/ml in tampone carbonato/bicarbonato 50 mM a pH 9,6. Le micropiastre sono state incubate a temperatura ambiente per 8 h. In seguito sono state lavate per 3 volte con PBS 10 mM contenente 0,05% Tween 20.

Cento microlitri di campioni culturali (S), controllo positivo, controllo negativo e brodo

culturale negativo (N) sono stati dispensati nelle micropiastre e incubati per 1 h a 37°C in agitazione. Le micropiastre sono state lavate come in precedenza. Cento µl di anticorpo monoclonale 6F12C8, coniugato con perossidasi (6F12C8-HRP) alla diluizione d'uso di 1:20000, sono stati dispensati in tutti i pozzetti. Le micropiastre sono state incubate per 1 h a 37°C. Dopo un ulteriore lavaggio, sono stati dispensati 100 µl di substrato cromogeno (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA) e dopo 30' di incubazione a temperatura ambiente la reazione enzimatica è stata interrotta aggiungendo nei pozzetti 50 µl di acido solforico 0,5 N. La densità ottica è stata misurata a 450 nm con un lettore per micropiastre. I campioni esaminati sono stati diagnosticati positivi o negativi in relazione alla presenza di *L. monocytogenes*, sulla base del quoziente (S/N) tra densità ottica dei campioni

testati (S) e densità ottica prodotta dal brodo Fraser utilizzato come controllo negativo (N) per *L. monocytogenes*.

Il limite di rivelazione del metodo (LOD) è stato determinato mediante titolazione con diluizioni seriali di una coltura di *L. monocytogenes* (ATCC 7644) in brodo Fraser. Il LOD è stato calcolato interpolando sulla curva standard il valore medio di assorbanza del brodo Fraser negativo più tre volte la deviazione standard. Il numero di organismi presenti nella coltura è stato determinato mediante conteggio in piastra contenente Oxford Agar.

### Validazione del *Listeria monocytogenes* capture ELISA

Il metodo *L. monocytogenes* capture ELISA è stato validato secondo quanto indicato nella norma ISO 16140:2003 relativamente ai metodi di analisi qualitativi (13). Il dosaggio è stato validato analizzando prodotti carnei, ittici e lattiero-caseari (Tabella II). Sono stati valutati, mediante l'esecuzione di prove intra-laboratorio, i parametri di accuratezza relativa, sensibilità relativa, specificità relativa, livello di rivelazione relativo e selettività. L'analisi dei dati discordanti è stata effettuata mediante i test statistici McNemar e Kappa di Cohen.

### Accuratezza relativa, sensibilità relativa e specificità relativa

Le determinazioni dell'accuratezza relativa, della sensibilità relativa e della specificità relativa sono state effettuate analizzando campioni naturalmente e artificialmente contaminati con ceppi di *L. monocytogenes* e campioni non contaminati. I campioni contaminati artificialmente sono stati preparati con sospensioni contenenti un livello finale di *L. monocytogenes* di  $10^2$  cfu/g. I campioni sono stati analizzati in parallelo sia con il metodo di riferimento che con *L. monocytogenes* capture ELISA. Sono stati analizzati 220 campioni di alimenti, 76 campioni di prodotti carnei, 68 di prodotti ittici e 76 di prodotti lattiero-caseari (Tabella II).

### Livello di rivelazione relativo

Il livello di rivelazione relativo è stato determinato utilizzando, per l'analisi dei campioni, appartenenti alle 3 tipologie di alimento, artificialmente contaminati con 5-10, 50-100 e 100-1000 cfu/g di *L. monocytogenes*, sia il metodo di riferimento che il metodo *L. monocytogenes* capture ELISA. Come controllo negativo è stato impiegato un campione non contaminato per ogni tipologia di alimento. Ogni campione è stato analizzato 6 volte con ciascun metodo. La concentrazione di *L. monocytogenes* utilizzata per la preparazione dei campioni artificialmente contaminati è stata determinata mediante

Tabella II  
Campioni analizzati per la valutazione della accuratezza relativa, della sensibilità relativa e della specificità relativa di *Listeria monocytogenes* capture ELISA

Tipologia	Prodotto	Numero di campioni positivi		Numero campioni negativi
		NC	AC	
Prodotti carnei	Salsiccia	-	2	-
	Salame	-	2	9
	Pollo muscolo	-	13	34
	Carne di pollo conf.	2	13	-
	Prosciutto crudo	-	-	1
Prodotti ittici	Salmone	33	-	35
Prodotti lattiero caseari	Gorgonzola	3	-	-
	Camembert	2	-	20
	Caciotta	32	-	19

NC naturalmente contaminati

AC artificialmente contaminati (*spiked*)

titolazione in piastra e misura della densità ottica.

### Selettività

La selettività è stata determinata analizzando campioni di alimenti contaminati artificialmente con ceppi target di *L. monocytogenes* e ceppi di batteri non target (Tabella I). Sono stati analizzati complessivamente 55 campioni appartenenti alle tre tipologie di alimenti impiegati, di cui 35 infettati con un ceppo di *L. monocytogenes* e con altri ceppi non target e i restanti 20 campioni infettati esclusivamente con ceppi non target.

## Risultati

### Anticorpi monoclonali

Per l'impiego di *L. monocytogenes* capture ELISA è stato prodotto un pannello di 8 MAb anti-*L. monocytogenes*. Il MAb 9B8F7, isotipo IgG<sub>1</sub>, anti K, è stato selezionato come anticorpo di cattura e l'anticorpo monoclonale 6F12C8,

isotipo IgG<sub>3</sub>, anti K, coniugato con perossidasi, è stato utilizzato come anticorpo secondario. Gli altri MAb non hanno fornito un segnale significativamente maggiore di quello ottenuto dal brodo colturale negativo anche quando sono stati testati con elevate concentrazioni del batterio.

### *Listeria monocytogenes* capture enzyme-linked immunosorbent assay

Il dosaggio *L. monocytogenes* capture ELISA ha evidenziato la capacità di rivelare i ceppi di *L. monocytogenes*. Sono state riscontrate reazioni crociate con *L. innocua* e *L. ivanovii*, non sono state evidenziate reazioni crociate con le altre sospensioni batteriche analizzate (Tabella III).

L'anticorpo monoclonale 6F12C8-HRP è stato utilizzato alla diluizione di lavoro di 1:20000. Il LOD per *L. monocytogenes* è stato calcolato interpolando sulla curva standard il valore medio di assorbanza del brodo colturale negativo (N) più un valore pari a tre volte la deviazione standard. Il LOD è risultato pari a

Tabella III

Ceppi batterici e risultati dell'analisi delle reazioni crociate di *Listeria monocytogenes* capture ELISA. Con rapporto S/N  $\geq 1,55$ : il campione è stato considerato positivo. Con rapporto S/N  $< 1,55$ : il campione non ha mostrato reazione crociata

Batterio ( $2 \times 10^8$ cfu/ml)	S/N	Batterio ( $2 \times 10^8$ cfu/ml)	S/N
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	0,9	<i>L. monocytogenes</i>	6,5
<i>Bacillus cereus</i>	0,7	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 49132)	0,9
<i>Bacillus subtilis</i>	1,2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,9
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0,7	<i>Salmonella bredeney</i>	0,8
<i>Citrobacter freundii</i>	0,9	<i>Salmonella derby</i>	0,7
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,9	<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)	1,1
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0,9	<i>Salmonella enteritidis</i>	1,0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,8	<i>Salmonella hadar</i>	0,8
<i>Enterococcus faecium</i>	0,3	<i>Salmonella muenchen</i>	0,7
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1,0	<i>Salmonella panama</i>	0,8
<i>Escherichia coli</i> O14 (BGVV)	1,1	<i>Salmonella saint-paul</i>	0,8
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0,9	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	0,9
<i>Escherichia fergussoni</i>	0,9	<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	1,2
<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC 49131)	0,9	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,1
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	5,8	<i>Staphylococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	0,6
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC 19119)	6,3	<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 23715)	0,8
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644)	6,3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,8

S campione

N controllo negativo

Quando il rapporto S/N  $\geq 1,55$ : il campione è considerato positivo

Quando S/N  $< 1,55$  il campione non mostra reazione crociata

6,6 × 10<sup>3</sup> cfu/ml e il valore di cut-off, espresso come S/N, è risultato di 1,55. I campioni di alimenti esaminati che hanno prodotto un valore di S/N maggiore o uguale al valore di cut-off sono stati considerati positivi per *L. monocytogenes*, i rimanenti campioni sono stati considerati negativi. Con *L. monocytogenes* capture ELISA, 51 campioni sono risultati positivi per *L. monocytogenes* e 22 negativi. Gli stessi campioni sono stati analizzati con metodi microbiologici standard ottenendo lo stesso risultato. Dal confronto con il metodo ufficiale ISO 11290-1:1996 per la rivelazione di *L. monocytogenes*, la sensibilità e la specificità diagnostica del dosaggio impiegato sono state del 100%, l'accuratezza del 100% e l'indice di concordanza è risultato significativo, con K = 1,0 (Tabella IV).

La ripetibilità del metodo *L. monocytogenes* capture-ELISA, determinata analizzando un campione di alimento positivo e uno negativo per *L. monocytogenes*, è stata di 11,9 CV% per il campione positivo e di 9,3 CV% per quello negativo, la riproducibilità è stata di 9,1 CV%

per il campione positivo e di 10,8 CV% per quello negativo (Tabella V).

### Accuratezza relativa, sensibilità relativa, specificità relativa, livello di rivelazione relativo e selettività

I risultati su accuratezza relativa, sensibilità relativa e specificità relativa, derivanti dall'analisi dei campioni mediante il metodo di riferimento e il metodo *L. monocytogenes* capture ELISA sono riportati nelle Tabelle VI, VII e VIII. Il livello di rivelazione relativo è stato di 5-10 cfu/g (Tabella IX). Per quanto riguarda la selettività, *L. monocytogenes* capture ELISA ha correttamente identificato come positivi tutti i campioni contaminati con *L. monocytogenes* e come negativi tutti i campioni contaminati con ceppi non target (Tabella X).

## Discussione

Le listeriosi nell'uomo sono infezioni a bassa incidenza ma con esiti spesso gravi. Il

Tabella IV

Valori di accuratezza, sensibilità, specificità e concordanza del *Listeria monocytogenes* capture ELISA: confronto con i risultati dell'ISO 11290-1:1996 (Intervallo di confidenza = 95%)

<i>Listeria monocytogenes</i> capture ELISA		ISO 11290-1:1996		Totale
		Positivi	Negativi	
	Positivi	51	0	51
	Negativi	0	22	22
	Totale	51	22	73
			LCL	UCL
Accuratezza	100%		96,0%	100%
Sensibilità	100%		94,4%	100%
Specificità	100%		87,8%	100%
Indice Kappa = 1.0	<i>p</i> <0.05			

LCL limite inferiore di confidenza  
UCL limite superiore di confidenza

Tabella V

Valori di ripetibilità e riproducibilità di *Listeria monocytogenes* capture ELISA

Campione	No.	Ripetibilità			No.	Riproducibilità		
		S/N	SD	CV%		S/N	SD	CV%
Positivo	80	18,3	2,176	11,9	160	18,6	1,695	9,1
Negativo	80	1,1	0,099	9,3	160	1,1	0,115	10,8

S campione  
N controllo negativo  
SD deviazione standard  
CV coefficiente di variazione

Tabella VI

Accuratezza relativa, sensibilità relativa, specificità relativa e concordanza di  
*Listeria monocytogenes* capture ELISA in campioni di prodotti carnei  
(Intervallo di confidenza = 95%)

		ISO 11290-1:1996		Totale
		Positivi	Negativi	
<i>Listeria monocytogenes</i> capture ELISA	Positivi	30	0	30
	Negativi	2	44	46
	Totale	32	44	76
		LCL		UCL
Accuratezza relativa	97,4%		90,9%	99,2%
Sensibilità relativa	93,8%		79,8%	98,1%
Specificità relativa	100,0%		93,6%	100,0%
Indice Kappa = 0,95	$p < 0,05$			
McNemar $\chi^2 = 0,500$	$p > 0,05$			

LCL limite inferiore di confidenza  
UCL limite superiore di confidenza

Tabella VII

Accuratezza relativa, sensibilità relativa, specificità relativa e concordanza di  
*Listeria monocytogenes* capture ELISA in campioni di prodotti ittici  
(Intervallo di confidenza = 95%)

		ISO 11290-1:1996		Totale
		Positivi	Negativi	
<i>Listeria monocytogenes</i> capture ELISA	Positivi	31	5	36
	Negativi	2	30	32
	Totale	33	35	68
		LCL		UCL
Accuratezza relativa	89,7%		80,2%	94,9%
Sensibilità relativa	93,9%		80,3%	99,3%
Specificità relativa	85,7%		73,0%	85,7%
Indice Kappa = 0,79	$p < 0,05$			
McNemar $\chi^2 = 0,570$	$p > 0,05$			

LCL limite inferiore di confidenza  
UCL limite superiore di confidenza

Tabella VIII

Accuratezza relativa, sensibilità relativa, specificità relativa e concordanza di  
*Listeria monocytogenes* capture ELISA in campioni di prodotti lattiero-caseari  
(Intervallo di confidenza = 95%)

		ISO 11290-1:1996		Totale
		Positivi	Negativi	
<i>Listeria monocytogenes</i> capture ELISA	Positivi	35	0	35
	Negativi	2	39	41
	Totale	37	39	76
		LCL		UCL
Accuratezza relativa	97,4%		90,7%	99,2%
Sensibilità relativa	94,6%		82,3%	100,0%
Specificità relativa	100,0%		92,8%	99,2%
Indice Kappa = 0,95	$p < 0,05$			
McNemar $\chi^2 = 0,550$	$p > 0,05$			

LCL limite inferiore di confidenza  
UCL limite superiore di confidenza

Tabella IX

Livello di rivelazione relativo a *Listeria monocytogenes* capture ELISA in campioni artificialmente contaminati

Campioni di prodotti	Livello di contaminazione (cfu/g)	Percentuale di positività	
		ISO 11290-1:1996	<i>Listeria monocytogenes</i> capture ELISA
Carnei	0	0%	0%
Carnei	5	40%	0%
Carnei	10	100%	100%
Carnei	100	100%	100%
Carnei	1 000	100%	100%
Ittici	0	0%	0%
Ittici	5	40%	0%
Ittici	10	100%	100%
Ittici	100	100%	100%
Ittici	1 000	100%	100%
Lattiero-caseari	0	0%	0%
Lattiero-caseari	5	40%	0%
Lattiero-caseari	10	100%	100%
Lattiero-caseari	100	100%	100%
Lattiero-caseari	1 000	100%	100%

ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*

Tabella X

Risultati delle prove di selettività su prodotti carnei, ittici e lattiero-caseari (Intervallo di confidenza = 95%)

<i>Listeria monocytogenes</i> capture ELISA		ISO 11290-1:1996		Totale
		Presente	Assente	
	Positivi	35	0	35
	Negativi	0	20	20
	Totale	35	20	55
	Selettività		LCL	UCL
Prodotti carnei	100%		90.3%	100%
Prodotti ittici	100%		90.3%	100%
Prodotti lattiero-caseari	100%		90.3%	100%

ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay*

LCL limite inferiore di confidenza

UCL limite superiore di confidenza

Regolamento (CE) 2073/2005 (6) prevede, sia per la ricerca di organismi patogeni (criteri di sicurezza) che per gli organismi indicatori (criteri di igiene), l'utilizzo di norme ISO o di metodi alternativi che siano stati validati secondo la norma ISO 16140:2003. I metodi innovativi, validati ai sensi della norma ISO 17025:2005 (14), sono consigliati qualora migliorino i tempi di risposta delle analisi. Il metodo *Listeria monocytogenes* capture ELISA è stato pertanto confrontato con il metodo ISO 11290-1:1996 (12) secondo quanto previsto dalla ISO 16140:2003 (13, 25). I valori di accuratezza,

sensibilità e specificità relative riscontrati nella validazione condotta sulle tre tipologie di alimenti hanno mostrato un elevato grado di concordanza del dosaggio rispetto al metodo di riferimento. Il livello di rivelazione relativo è stato adeguatamente correlato al LOD del dosaggio in quanto la singola fase di arricchimento del campione di alimento, che precede l'analisi con *Listeria monocytogenes* capture ELISA, ha consentito un notevole incremento delle cfu/ml a garanzia della rivelazione di *Listeria monocytogenes* al minimo livello determinato di contaminazione. Lo studio della selettività

ha evidenziato come il dosaggio sia stato specifico per *L. monocytogenes* anche in presenza di batteri non target non essendo state rivelate reazioni crociate, causa frequente di diagnosi erroneamente positive spesso riscontrate con simili dosaggi.

I risultati della validazione effettuata mediante il confronto con il metodo ISO 11290-1:1996 hanno dimostrato che il metodo *L. monocytogenes* capture ELISA può essere utilizzato nello screening degli alimenti, riducendo il tempo necessario per l'analisi mediante un solo arricchimento in brodo colturale ed evitando di processare, mediante il metodo ufficiale, tutti i campioni di alimenti risultati negativi. Lo sviluppo del dosaggio in

formato kit pronto all'uso potrebbe fornire un valido strumento diagnostico da utilizzare in parallelo alle procedure ufficiali di conferma della presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti.

## Supporto finanziario

La ricerca è stata finanziata con il contributo del Ministero della Salute Italiano, Progetto di Ricerca Finalizzata 2000 "Determinazione simultanea di patogeni in alimenti con metodi immunometrici luminescenti".

## Bibliografia

1. Ansari A.A. & Chang T.S. 1993. Immunochemical studies to purify rabbit and chicken immunoglobulin G antibody protein A-Sepharose chromatography. *Am J Vet Res*, **44**, 902-906.
2. Axelsson F. & Sorin M.L. 1998. *Transia Listeria* technical handbook. Diffchamb AB, Vastra Frolunda, 1-50.
3. Butman B.T., Plank M.C., Durham R.J. & Mattingly J.A. 1988. Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen. *Appl Environ Microbiol*, **54**, 1564-1569.
4. Campbell A.M. 1987. Monoclonal antibody technology. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (R.H. Burdon & P.H. van Knippenberg, eds). Elsevier Science BV, Amsterdam, **13**, 1-265.
5. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C. & Comi G. 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 6273-6282.
6. Commissione delle Comunità Europee (CE) 2005. Regolamento (CE) n.2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazz Uff*, **L 338**, 22.12.2005, 1-26 ([eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:it:pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:it:pdf) ultimo accesso 28 Giugno 2011).
7. Duffy G., Cloak O.M., Sheridan J.J., Blair I.S. & McDowell D.A. 1999. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. *Int J Food Microbiol*, **49**, 151-159.
8. Erdenlig S., Ainsworth A.J. & Austin F.W. 1999. Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2827-2832.
9. Farber J.M. & Peterkin P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, **55**, 476-511.
10. Giovannini A., Migliorati G., Principe V., Calderone D., Zoccolo C. & Cozzolino P. 2007. Risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food Control*, **18** (7), 789-799.
11. Goding J.W. 1993. Monoclonal antibodies: principles and practice. Production and application of monoclonal antibodies in cell. Biology, biochemistry and immunology. Chapter 8: Production of monoclonal antibodies, Third Ed. Academic Press Limited, London, 141-191.
12. International Organization for Standardization (ISO) 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and numeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. AMD 1: 2004. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. ISO, Geneva, ISO 11290-1:1996 + AMD 1, 1-13.
13. International Organization for Standardization (ISO) 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. ISO, Geneva, ISO 16140:2003, 1-74.

14. International Organization for Standardization (ISO)/International Electrotechnical Commission (IEC) 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, 17025:2005, 1-25.
15. Karamonova L., Blazkova M., Fukal L, Rauch P., Greifova M., Horakova K., Tomaska M., Roubal P., Brett G.M. & Wyatt G.M. 2003. Development of an ELISA specific for *Listeria monocytogenes* using a polyclonal antibody raised against a cell extract containing internalin B. *Food Agric Immunol*, **15**, 167-182.
16. Low J.C., Davies R.C. & Donachie W. 1992. Purification of listeriolysin O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infections in sheep. *J Clin Microbiol*, **30**, 2705-2708 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270502/pdf/jcm00034-0199.pdf> ultimo accesso 28 Giugno 2011).
17. Luciani M., Armillotta G., Magliulo M., Portanti O., Di Febo T., Di Giannatale E., Roda A. & Lelli R. 2006. Produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali specifici per *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Ital*, **42** (3), 173-182 ([http://www.izs.it/vet\\_italiana/2006/42\\_3/173.pdf](http://www.izs.it/vet_italiana/2006/42_3/173.pdf) ultimo accesso 27 Giugno 2011).
18. Magliulo M. Simoni P., Guardagli M., Nichelini E., Lucani M., Lelli R. & Roda A. 2007. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria. *J Agric Food Chem*, **55** (13), 4933-4939.
19. Malavasi F. & Bargellesi-Severi A. 1992. Anticorpi monoclonali: tecniche di base. PhD. 02. In I manuali delle scuole. Edizioni SOSB-SIOMS, Genova, 1-208.
20. Nakane P.K. & Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, **22**, 1084-1091.
21. Oyarzabal O., Behnke N. & Mozola M. 2006. Validation of a microwell DNA probe assay for detection of *Listeria* spp. in foods. *J AOAC Int*, **89** (3), 651-668.
22. Palumbo J.D., Borucki M.K., Mandrell R.E. & Gorski L. 2003. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *J Clin Microbiol*, **41**, 564-571.
23. Scheu P., Gasch A. & Berghof K. 1999. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. *Lett Appl Microbiol*, **29**, 416-420.
24. Schuchat A., Swaminathan B. & Broome C.V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev*, **4**, 169-183.
25. Scotter S.L., Langton S., Lombard B, Schulten S, Nagelkerke N., In'T Veld P.H., Rollier P. & Lahellec C. 2001. Validation of ISO method 11290, Part 1: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol*, **70** (1-2), 121-129.
26. Sewell A.M., Warburton D.W., Boville A., Daley E.F. & Mullen K. 2003. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int J Food Microbiol*, **81**, 123-129.
27. Torensma R., Visser M.J.C., Aarsman C.J.M., Poppelier M.J.J.G., Fluit A.C. & Verhoef J. 1993. Monoclonal antibodies that react with live *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 2713-2716.
28. Yu K.Y., Noh Y.S., Chung M.S., Park H.J., Lee N.S., Youn M.Y., Jung B.Y. & Youn B.S. 2004. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **11** (3), 446-451.