

# SVILUPPO DI SAGGI ELISA PER LA DETERMINAZIONE DELLO STAFILOCOCCO AUREO NEGLI ALIMENTI

E. Delibato\*, M. Bancone, G. Volpe, D. Moscone, L. Croci\*, G. Palleschi

\*Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio Alimenti, v.le Regina Elena 299, 00161 Roma, Italia.  
Dip.di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di "Tor Vergata" via della Ricerca Scientifica,  
00133 Roma, Italia. e-mail: [giulia.volpe@uniroma2.it](mailto:giulia.volpe@uniroma2.it)

## Introduzione

Il consumo di prodotti carnei, conservati e preparati in condizioni non idonee rappresenta tuttora uno dei principali problemi di sanità pubblica, soprattutto in relazione alle malattie dovute alla presenza accidentale nei prodotti di microrganismi patogeni o di loro tossine. Si tratta di specie microbiche note da lungo tempo, in parte adattate ai nuovi processi tecnologici, o anche di vere e proprie specie emergenti. Tra questi un ruolo primario è sicuramente rivestito da: *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* che sono la principale causa di tossinfezione alimentari nei paesi industrializzati. Tali germi sono in grado di provocare contaminazioni dirette e indirette degli alimenti che possono verificarsi in ogni fase della produzione, dalle materie prime alla trasformazione, conservazione e utilizzazione degli alimenti.

I test microbiologici convenzionali, basati sulla capacità dei microrganismi di svilupparsi e di formare colonie visibili, sono molto sensibili ed economici ma richiedono successivi "steps" colturali e necessitano di tempi piuttosto lunghi. Con l'implementazione del sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) da parte delle industrie alimentari è universalmente sentita la necessità di disporre di metodi di analisi semplici, rapidi ed affidabili per accertare la presenza di batteri patogeni negli alimenti. In particolare, saggi che possano essere completati in pochi minuti o ore permetterebbero di adottare rapide azioni correttive in caso di positività. Per soddisfare queste esigenze, in questi ultimi anni sono stati sviluppati un grande numero di metodi di screening basati su reazioni antigene-anticorpo [1-4].

Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di saggi ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) per la determinazione dello *Staphylococcus aureus* negli alimenti.

I saggi sviluppati, di tipo "sandwich", prevedono che la determinazione dello *S. aureus* avvenga mediante l'uso di comuni IgG e di anticorpi specifici per la proteina A, antigene localizzato nella parete cellulare dello *S. aureus* (e non in quella di altri batteri) e che viene esposto in superficie previa bollitura delle cellule. A tale scopo IgG umane, immobilizzate sulla superficie di una convenzionale piastra ELISA, sono state fatte interagire (mediante la regione Fc = frammento costante) prima con soluzioni standard di proteina A e poi con brodculture pure di *S. aureus*. In entrambi i casi il sandwich veniva completato utilizzando anticorpi monoclonali o policlonali specifici per la proteina A. Per la rivelazione sono stati impiegati anticorpi secondari coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina (AP) utilizzando come substrato il para-nitrofenilfosfato.

I saggi sviluppati sono stati confrontati in termini di specificità, sensibilità e limite minimo di rilevabilità.

Attualmente, per incrementare il segnale colorimetrico, generato dalla fosfatasi alcalina, si sta valutando un sistema di amplificazione enzimatica in cui il marcatore converte il NADPH in NADH che è il cofattore essenziale per un successivo ciclo di reazioni che conduce alla rigenerazione del NADH.

## Parte sperimentale

### Materiali e metodi

Ig G umane, proteina A, anticorpi anti-proteina A sia monoclonali (di mouse) che policlonali (di rabbit), p-nitrofenilfosfato, tween 20 erano forniti dalla Sigma (St. Louis, MO, USA). IgG anti-mouse ed anti-rabbit, coniugate con fosfatasi alcalina (3 mg/mL), erano acquistate dalla Vector Laboratories (Inc. Berlingame, CA, USA); mentre piastre di polistirene con 96 pozzetti, superficie

Maxisorp™, erano fornite dalla Nunk (Roskilde, Denmark). Il latte in polvere era acquistato dalla Bio-Rad, Hercules, CA, USA, mentre il sistema di amplificazione enzimatica (Ampli Q) era fornito dalla DAKO Cytomation, Ely, UK. Ceppi batterici, quali *S. aureus* (ATCC 29213), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. xyloso* (ATCC 29971), e i tutti i terreni di coltura erano forniti dalla Oxoid (Ltd, Basingstoke, UK). Un lettore di micropiastre, modello 550 (Bio-Rad,), veniva utilizzato per leggere le assorbanze a 405 o 490 nm.

### Procedure

#### Colture batteriche.

L'allestimento delle colture batteriche di stafilococco ha previsto tre fasi.

#### Prima fase:

- rivitalizzazione del ceppo (1 ansa) mediante incubazione in 10 mL di terreno HBI (Brain Heart Infusion Broth) per 24 h a 37 °C;
- semina su TSA (Tryptone Soya Agar) a becco di clarino ed incubazione per 24 h a 37 °C
- conservazione della coltura batterica in TSA a 4 °C.

#### Seconda fase:

- semina della coltura batterica (mantenuta a 4 °C) in HBI ed incubazione per 24 h a 37 °C;
- centrifugazione della brodocoltura ottenuta a 3000 rpm per 15 min e sospensione del pellet in soluzione fisiologica;
- determinazione della carica batterica mediante turbidimetria (trasmittanza ad una  $\lambda = 540$ ) e, parallelamente, con il metodo delle diluizioni seriali e della semina per inclusione su PCA (Plate Count Agar).

#### Terza fase:

- centrifugazione di 50 ml della brodocoltura a 3000 rpm per 15 minuti, sospensione del pellet in PBS (phosphate buffered saline);
- bollitura per 15 minuti e aggiustamento del volume a 50 mL.

La sospensione veniva quindi aliquotata e conservata a - 20 °C fino al momento dell'uso.

### ELISA

In questi saggi di tipo sandwich, che prevedevano l'immobilizzazione delle IgG umane su fase solida, sono stati utilizzati:

- anticorpi monoclonali (MAb) specifici per proteina A ed anticorpi secondari anti-mouse coniugati con fosfatasi alcalina (Ab<sub>2</sub>-AP).
- anticorpi policlonali (PAb) specifici per proteina A ed anticorpi secondari anti-rabbit coniugati con fosfatasi alcalina (Ab<sub>2</sub>-AP).

Uno schema dei saggi sviluppati è riportato in fig. 1

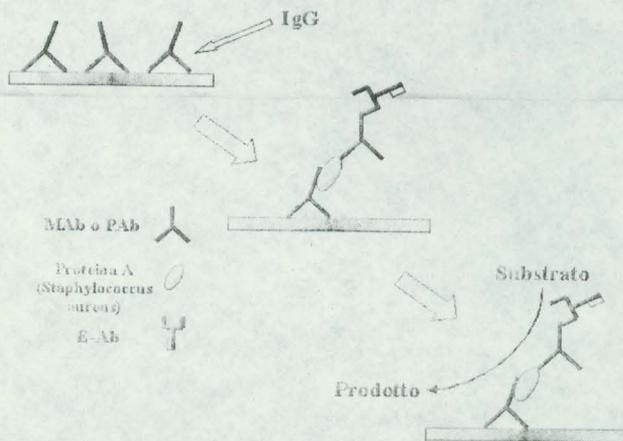


Figura 1. Schema dei saggi sviluppati

Il protocollo impiegato era il seguente:

200  $\mu$ L di una soluzione di IgG umane (10  $\mu$ g/mL), preparata in tampone carbonato 0.1 M pH 9.6, venivano addizionati nei pozzetti della piastra ELISA e lasciati ad incubare per tutta la notte a 4 °C. In ordine seguivano: bloccaggio con latte in polvere al 3% (1 h a RT); addizione di 200  $\mu$ L di soluzioni standard di proteina A o di stafilococco (2 h a RT); incubazione (1 h a RT) con una soluzione di PAb (1:10000) o di MAb (1:10000); incubazione (1 h a RT) con una soluzione di Ab<sub>2</sub>-AP (1:1000) anti-mouse o anti-rabbit.

Tutte le soluzioni, ad eccezione di quella utilizzata per il "coating" venivano preparate in PBS e, tra tutti gli steps menzionati venivano effettuati tre rapidi lavaggi co PBS addizionato con tween 20 allo 0.05%.

Infine 200  $\mu$ l di una soluzione di p-nitrofenolo preparata in tampone DEA (dietanolammina) 0.97 M + MgCl<sub>2</sub> 5 x 10<sup>-4</sup> M pH 9.8 venivano addizionati nei pozzetti e dopo 30 min di incubazione si procedeva alla lettura a 405 nm.

Parallelamente 200  $\mu$ L della soluzione Ampli Q (preparata secondo le istruzioni del Kit) venivano addizionati nei pozzetti e dopo 10 min di incubazione si procedeva alla lettura a 490 nm.

## Risultati

Lo sviluppo dei due saggi di tipo "sandwich" ha previsto l'ottimizzazione di numerosi parametri quali la quantità di IgG da immobilizzare, la concentrazione di MAb e PAb, la concentrazione di Ab<sub>2</sub>-AP, i tempi e le temperature di incubazione. Le condizioni ottimali sono quelle riportate nella procedura sopra descritta.

In fig. 2a e 2b sono mostrate due curve di calibrazione ottenute con soluzioni standard di proteina A utilizzando anticorpi monoclonali (a) e policlonali (b) ed il p-nitrofenilfosfato come substrato.

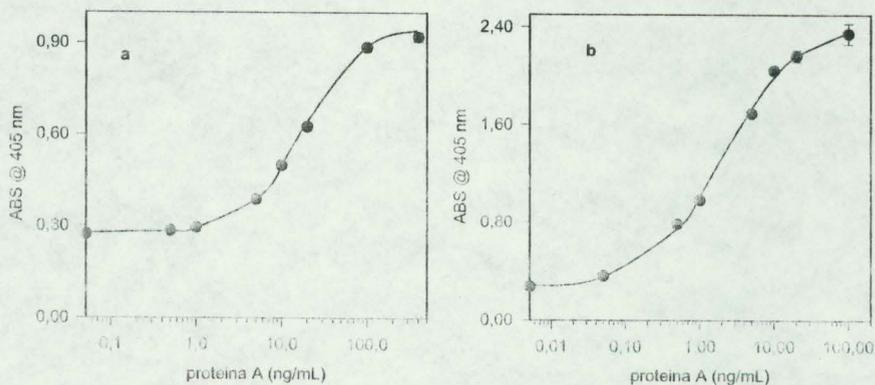


Fig. 2: curve di calibrazione per proteina A, a = MAb, b = PAb

Analogamente in fig. 3a e 3b sono riportate curve di calibrazione con brodculture pure di *S. aureus*.

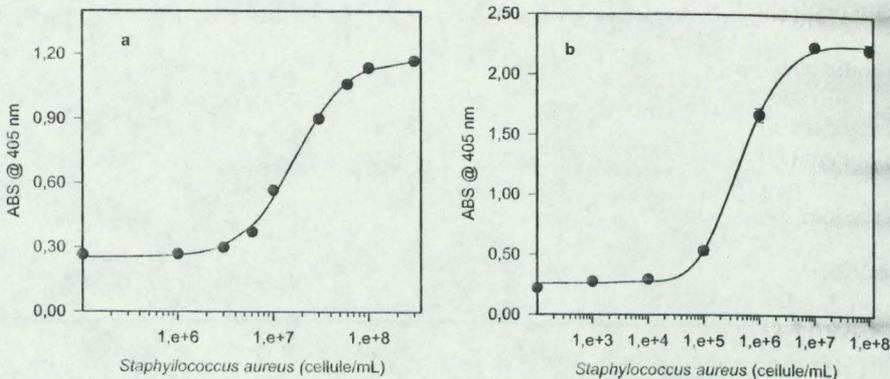


Fig. 3: curve di calibrazione per *S. aureus*, a = MAb, b = PAb

In tutti i casi i dati sperimentali sono stati fittati utilizzando la seguente equazione logistica a 4 parametri:

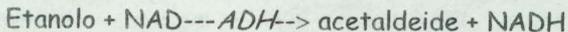
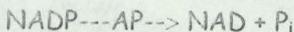
$$f(x) = \frac{a-d}{1+(x/c)^b} + d$$

dove  $a$  e  $d$  sono gli asintoti massimo e minimo,  $c$  è il punto di flesso e  $b$  la pendenza della curva. Il limite minimo di rilevabilità (LOD), definito come la concentrazione a cui corrisponde un valore di  $f(x)$  pari al valore medio dello standard zero più tre volte la sua deviazione standard (valore medio + 3s), è risultato essere di 0.6 ng/mL per la proteina A e di  $2 \times 10^6$  cellule/mL per lo *S. aureus*, quando si utilizzavano anticorpi monoclonali. L'uso di anticorpi policlonali ha consentito di rilevare 0.01 ng/mL di proteina A e  $2 \times 10^4$  cellule/mL di *S. aureus*.

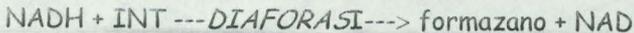
Relativamente ai saggi condotti utilizzando brodculture pure di *S. aureus*, la sensibilità, definita come la concentrazione di antigene necessaria a produrre un incremento del segnale del 25%, è risultata essere di  $9 \times 10^6$  e di  $2 \times 10^5$  utilizzando rispettivamente anticorpi monoclonali e policlonali.

Inoltre, è stata valutata l'eventuale interferenza da parte di altri ceppi batterici quali *S. epidermidis* e *S. xylosus*; i risultati ottenuti hanno evidenziato una specificità di risposta nei confronti dello *S. aureus* ed assenza di cross-reattività per gli altri ceppi testati.

Attualmente, per incrementare il segnale colorimetrico, generato dalla fosfatasi alcalina, si sta valutando un sistema di amplificazione enzimatica (Ampli Q) basato sulle seguenti reazioni:



*ADH* = alcool-deidrogenasi



*INT* = p-iodonitrotetrazolio.

Il NAD generato dalla terza reazione enzimatica torna in ciclo, e per ciascun ciclo si ha produzione di una molecola di formazano che viene misurato spettrofotometricamente a 490 nm.

Per entrambi i saggi sviluppati l'uso di tale sistema ha generato un incremento del segnale di circa 100 volte

### Conclusioni

In questo lavoro vengono presentati due saggi ELISA di tipo sandwich per la determinazione dello *S. aureus*. Le prove finora condotte su colture batteriche pure rappresentano la prima fase di uno studio mirato alla determinazione di tale microrganismo negli alimenti. A tale scopo, saranno effettuate analisi su campioni alimentari sperimentalmente e non sperimentalmente contaminati.

Si procederà quindi alla realizzazione di un immunosensore elettrochimico basato su elettrodi "screen-printed", elettrodi miniaturizzati ottenuti mediante stampa serigrafia, utilizzabili come "usa e getta". Tali elettrodi verranno impiegati sia come supporto per l'immobilizzazione dei biocomponenti sia come trasduttori di segnale.

In alternativa l'immobilizzazione degli anticorpi verrà effettuata sulla superficie di particelle magnetiche che permetteranno di effettuare una separazione specifica del microrganismo in esame direttamente dal campione, offrendo la possibilità di concentrare il microrganismo stesso. Infatti, radunando le particelle, con l'aiuto di un magnete, sarà possibile risospenderle in opportune aliquote di adatti tamponi. Dopo la reazione con il microrganismo patogeno e la formazione dell'immunocomplesso, le palline verranno localizzate direttamente sulla superficie dell'elettrodo mediante il magnete, in un format denominato ELIME (Enzyme-Linked Immuno-Magnetic Electrochemistry).

### **Bibliografia:**

- [1] Croci L., Delibato E., Volpe G., Palleschi G., *Anal. Lett.*, 2001, **34** (15), 2597-2607.
- [2] Chang Y. H., Chang T. C., Kao E. F., Chou C., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, **60** (10), 1571-1574.
- [3] Brewster J. D., Mazenko R. S., *J. Immunol. Methods.*, 1998, **211**, 1-8.
- [4] Mirhabibollahi B., Brooks J. L., Kroll R. G., *Lett. Appl. Microb.*, 1990, **11**, 119-122.

*Si ringrazia per il contributo finanziario il Ministero della Salute nell'ambito dei progetti della Ricerca Finalizzata.*